

08 SEP 2005

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

54350

021006

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
23. September 2004 (23.09.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 2004/081217 A2

BEST AVAILABLE COPY

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12N 15/82,  
C07K 14/415, C12N 15/29, A01H 5/00

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2004/002436 ✓

(22) Internationales Anmeldedatum:  
10. März 2004 (10.03.2004) ✓

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
103 11 118.2 ✓ 12. März 2003 (12.03.2003) DE(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von  
US): BASF PLANT SCIENCE GMBH [DE/DE]; 67056  
Ludwigshafen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): FRANK, Markus  
[DE/DE]; Rheindammstrasse 30, 68163 Mannheim (DE).  
KOGEL, Karl-Heinz [DE/DE]; Berggartenstrasse 7,  
35457 Lollar (DE). HÜCKELHOVEN, Ralph [DE/DE];  
Glaubrechtstr. 12, 35392 Giessen (DE). ✓(74) Anwalt: BIEBERBACH, Andreas; BASF Aktienge-  
sellschaft, 67056 Ludwigshafen (DE).(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für  
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,  
AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,  
CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES,  
FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,  
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,  
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,  
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM,  
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM,  
ZW.(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für  
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,  
GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,  
ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,  
TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,  
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT,  
RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,  
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

## Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu ver-  
öffentlichen nach Erhalt des BerichtsZur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-  
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-  
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der  
PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD FOR INCREASING RESISTANCE AGAINST STRESS FACTORS IN PLANTS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR ERHÖHUNG DER RESISTENZ GEGEN STRESSFAKTOREN IN PFLANZEN

(57) Abstract: The invention relates to a method for producing or increasing resistance against at least one biotic or abiotic stress factor in plants, preferably against plant pathogens, by increasing expression of at least one Bax inhibitor 1 (BI1) protein in at least one plant tissue, under the proviso that expression in leaf epidermis remains substantially unmodified. The invention relates further to recombinant expression cassettes and vectors that comprise a nucleic acid sequence coding for the BI protein under the control of a tissue-specific promoter, said promoter having substantially no activity in leaf epidermis. The invention further relates to recombinant plants that are transformed with said expression cassettes or vectors, to cultures, parts or recombinant propagation material derived thereof, and to the use of the same for producing food, feeding stuff, seeds, pharmaceuticals or fine chemicals.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft Verfahren zur Erzeugung oder Erhöhung der Resistenz gegen mindestens einen biotischen oder abiotischen Stressfaktor in Pflanzen, bevorzugt gegen pflanzliche Pathogene, durch Erhöhung der Expression mindestens eines Bax-Inhibitor 1 (BI1) Proteins in mindestens einem pflanzlichen Gewebe mit der Massgabe, dass die Expression in der Blattepidermis im wesentlichen unverändert bleibt. Die Erfindung betrifft ferner rekombinante Expressionskassetten und Vektoren, die eine für ein BI-Protein kodierende Nukleinsäuresequenz unter Kontrolle eines gewebespezifischen Promotors umfassen, wobei der Promotor im wesentlichen keine Aktivität in der Blattepidermis aufweist. Die Erfindung betrifft ferner mit besagten Expressionskassetten oder Vektoren transformierte rekombinante Pflanzen, davon abgeleitete Kulturen, Teile oder rekombinantes Vermehrungsgut, sowie die Verwendung derselben zur Herstellung von Nahrungs-, Futtermitteln, Saatgut, Pharmazeutika oder Feinchemikalien.

WO 2004/081217 A2

STK

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# Verfahren zur Erhöhung der Resistenz gegen Streßfaktoren in Pflanzen

## Beschreibung

5

Die Erfindung betrifft Verfahren zur Erzeugung oder Erhöhung der Resistenz gegen mindestens einen biotischen oder abiotischen Streßfaktor in Pflanzen, bevorzugt gegen pflanzliche Pathogene, durch Erhöhung der Expression mindestens eines Bax-Inhibitor 1 (BI1) Proteins in mindestens einem pflanzlichen Gewebe mit der Maßgabe, dass die Expression in der Blattepidermis im wesentlichen unverändert bleibt. Die Erfindung betrifft ferner rekombinante Expressionskassetten und Vektoren, die eine für ein BI-Protein kodierende Nukleinsäuresequenz unter Kontrolle eines gewebespezifischen Promotors umfassen, wobei der Promotor im wesentlichen keine Aktivität in der Blattepidermis aufweist. Die Erfindung betrifft ferner mit besagten Expressionskassetten oder Vektoren transformierte rekombinante Pflanzen, davon abgeleitete Kulturen, Teile oder rekombinantes Vermehrungsgut, sowie die Verwendung derselben zur Herstellung von Nahrungs-, Futtermitteln, Saatgut, Pharmazeutika oder Feinchemikalien.

25

Ziel biotechnologischer Arbeiten an Pflanzen ist die Herstellung von Pflanzen mit vorteilhaften, neuen Eigenschaften zum Beispiel zur Steigerung der landwirtschaftlichen Produktivität, zur Qualitätssteigerung bei Nahrungsmitteln oder zur Produktion bestimmter Chemikalien oder Pharmazeutika. Oft sind die natürlichen Abwehrmechanismen der Pflanze gegen Pathogene unzureichend. Allein Pilzkrankheiten führen zu Ernteverlusten in der Höhe von vielen Milliarden US-\$ jährlich. Die Einführung fremder Gene aus Pflanzen, Tieren oder mikrobiellen Quellen kann die Abwehr verstärken. Beispiele sind der Schutz gegen Insektenfraß in Tabak durch Expression von *Bacillus thuringiensis* Endotoxinen (Vaeck et al. (1987) Nature 328:33-37) oder der Schutz des Tabaks gegen Pilzbefall durch Expression einer Chitinase aus der Bohne (Broglie et al. (1991) Science 254:1194-1197). Die meisten der beschriebenen Ansätze gewähren jedoch nur eine Resistenz gegen ein einzelnes Pathogen oder gegen ein schmales Spektrum von Pathogenen.

40

Es gibt nur wenige Ansätze, die Pflanzen eine Resistenz gegen ein breiteres Spektrum von Pathogenen, vor allem Pilzpathogene, verleihen. Die systemische erworbene Resistenz ("systemic acquired resistance"; SAR) - ein Abwehrmechanismus bei verschiedenen Pflanze/Pathogen-Interaktionen - kann durch Applikation von endogene Botenstoffe wie Jasmonat (JA) oder

45

- Salizylsäure (SA) vermittelt werden (Ward et al. (1991) Plant Cell 3:1085-1094; Uknes et al. (1992) Plant Cell 4(6):645-656). Ähnliche Effekte können auch durch synthetische Verbindungen wie 2,6-Dichlorisonikotinsäure (DCINA) oder Benzo(1,2,3)thiadiazol-7-thiocarbonsäure-S-methylester (BTH; Bion®) (Friedrich et al. (1996) Plant J 10(1):61-70; Lawton et al. (1996) Plant J 10:71-82) bewirkt werden. Auch die Expression der im Rahmen eines SAR hochregulierten "pathogenesis related" (PR) Proteine vermag zum Teil eine Pathogenresistenz zu bewirken.
- In Gerste ist der Mlo-Locus als negativer Regulator der Pathogenabwehr beschrieben. Der Verlust oder Funktionsverlust ("loss-of-function") des Mlo-Gens bedingt eine erhöhte, rassen-unspezifische Resistenz gegen zahlreiche Mehltauisolate (Büschges R et al. (1997) Cell 88:695-705; Jorgensen JH (1977) Euphytica 26:55-62; Lyngkjaer MF et al. (1995) Plant Pathol 44:786-790).
- Das Mlo-Gen ist beschrieben (Büschges R et al. (1997) Cell 88:695-705; WO 98/04586; Schulze-Lefert P, Vogel J (2000) Trends Plant Sci. 5:343-348). Verschiedene Mlo-Homologe aus anderen Getreidearten wurden isoliert. Verfahren unter Verwendung dieser Gene zum Erzielen einer Pathogenresistenz sind beschrieben (WO 98/04586; WO 00/01722; WO 99/47552). Nachteilig ist, dass Mlo-defiziente Pflanzen auch in Abwesenheit eines Pathogens den o.g. Abwehrmechanismus initiieren, was sich in einem spontanen Absterben von Blattzellen äußert (Wolter M et al. (1993) Mol Gen Genet 239:122-128). Dadurch erleiden mlo-resistente Pflanzen eine Ertragseinbuße von ca. 5% (Jörgensen JH (1992) Euphytica 63: 141-152). Das spontane Absterben der Blattzellen bedingt ferner eine nachteilige Hypersuszeptibilität gegen nekrotrophe und hemibiotrophe Pathogene wie *Magnaporthe grisea* (*M. grisea*) oder *Cochliobolus sativus* (*Bipolaris sorokiniana*) (Jarosch B et al. (1999) Mol Plant Microbe Interact 12:508-514; Kumar J et al. (2001) Phytopathology 91:127-133).
- Faktoren die einen der mlo-Resistenz vergleichbaren Effekt gegen nekrotrophe Pilze vermitteln, konnten bislang nicht identifiziert werden. Dies mag an dem besonderen Infektionsmechanismus der nekrotrophen Pilze liegen: Anstelle einer Appressorien-vermittelten Penetration infundieren sie zunächst die pflanzliche Wirtszelle mit Mykotoxinen und Enzymen, was zu einem Absterben der Zelle führt. Erst danach wird die Zelle penetriert (Shirasu K and Schulze-Lefert P (2000) Plant Mol Biol 44:371-385). Ähnliche Infektionsstrategien verfolgen



bakterielle Pathogene wie *Erwinia carotovora* (Whitehead NA et al. (2002) *Antonie van Leeuwenhoek* 81: 223-231). Eine Penetrationsresistenz mit Hilfe von Papillenbildung etc. stellt hier keine effiziente Abwehrstrategie dar.

5 Apoptose, auch als programmierter Zelltod bezeichnet, ist ein essentieller Mechanismus zur Aufrechterhaltung der Gewebehomöostase und steht damit der Zellteilung als negativ regulierender Mechanismus gegenüber. Im vielzelligen Organismus  
10 ist die Apoptose ein natürlicher Bestandteil der Ontogenese und u.a. an der Entwicklung der Organe und der Beseitigung von gealterten, infizierten oder mutierten Zellen beteiligt. Durch die Apoptose wird eine effiziente Elimination von unerwünschten Zellen erreicht. Eine Störung oder Inhibition der Apoptose trägt  
15 zur Pathogenese verschiedener Erkrankungen bei, unter anderem zur Karzinogenese. Die Haupteffektoren der Apoptose sind Aspartat-spezifische Cystein-Proteasen, die sogenannten Caspasen. Ihre Aktivierung kann durch mindestens zwei Apoptose-Signalwege stattfinden: Zum einen durch die Aktivierung der TNF-  
20 (Tumor Necrosis Factor) Rezeptorfamilie, zum anderen spielen Mitochondrien eine zentrale Rolle. Die Aktivierung des mitochondrialen Apoptose-Signalweges wird durch Proteine der Bcl-2-Familie reguliert. Diese Proteinfamilie besteht aus anti-apoptotischen sowie pro-apoptotischen Proteinen wie z.B. Bax. Im  
25 Falle eines apoptotischen Stimulus findet eine allosterische Konformationsänderung des Bax-Proteins statt, welche zur Verankerung des Proteins in der mitochondrialen Außenmembran und seiner Oligomerisierung führt. Durch diese Oligomere werden pro-apoptotischen Moleküle aus den Mitochondrien ins Zytosol  
30 freigesetzt, die eine apoptotische Signalkaskade und letztlich die Degradierung spezifischer zellulärer Substrate bedingen, was den Zelltod zur Folge hat. Der Bax Inhibitor-1 BI1 wurde über seine Eigenschaft isoliert, die pro-apoptotische Wirkung von BAX zu inhibieren (Xu Q & Reed JC (1998) *Mol Cell* 1(3): 337-346).  
35 BI1 stellt ein hochkonserviertes Protein dar. Es findet sich überwiegend als integraler Bestandteil intrazellulärer Membranen. BI1 interagiert mit bcl-2 und bcl-xl. Überexpression von BI1 in Säugetierzellen unterdrückt die pro-apoptotische Wirkung von BAX, Etoposid und Staurosporin, aber nicht von Fas-Antigen (Roth W and Reed JC (2002) *Nat Med* 8: 216-218). Die  
40 Inhibition von BI1 durch antisense-RNA hingegen induziert Apoptose (Xu Q & Reed JC (1998) *Mol Cell* 1(3):337-346). Die ersten pflanzlichen Homologen von BI1 wurden aus Reis und *Arabidopsis* isoliert (Kawai et al. (1999) *FEBS Lett* 464:143-147;

Sanchez et al (2000) Plant J 21:393-399). Diese pflanzlichen Proteine supprimieren BAX-induzierten Zelltod in Hefe. Die Aminosäure-Sequenzhomologie zu menschlichem Bcl-2 beträgt ca. 45%. Das Arabidopsis-Homolog AtBcl-2 vermag in rekombinanten Pflanzen die pro-apoptotische Wirkung von BAX aus Maus zu supprimieren (Kawai-Yamada et al. (2001) Proc Natl Acad Sci USA 98(21):12295-12300). Das Reis (Oryza sativa) Bcl-2-Homolog OsBcl-2 wird in allen pflanzlichen Geweben exprimiert (Kawai et al. (1999) FEBS Lett 464: 143-147). Beschrieben sind ferner Bcl-2-Gene aus Gerste (Hordeum vulgare; GenBank Acc.-No.: AJ290421), Reis (GenBank Acc.-No.: AB025926), Arabidopsis (GenBank Acc.-No.: AB025927), Tabak (GenBank Acc.-No.: AF390556) und Raps (GenBank Acc.-No.: AF390555, Bolduc N et al. (2003) Planta 216:377-386). Die Expression von Bcl-2 in Gerste wird infolge einer Infektion mit Mehltau hochreguliert (Hückelhoven R et al. (2001) Plant Mol Biol 47(6):739-748).

WO 00/26391 beschreibt die Überexpression der anti-apoptotischen Gene Ced-9 aus C. elegans, sflAP aus Spodoptera frugiperda, bcl-2 aus Mensch sowie bcl-xl aus Huhn in Pflanzen zur Erhöhung der Resistenz gegen nekrotrophe bzw. hemibiotrophe Pilze. Pflanzliche Bcl-2 Homologe werden nicht offenbart. Die Expression erfolgt unter Kontrolle konstitutiver Promotoren. Beschrieben ist ferner die Expression eines Bcl-2 Proteins aus Arabidopsis unter dem starken konstitutiven 35S CaMV Promotor in Reiszellen und eine dadurch induzierte Resistenz gegen Zelltod induzierende Substanzen aus Magnaporthe grisea (Matsumura H et al. (2003) Plant J 33:425-434).

Überraschenderweise wurde im Rahmen dieser Erfindung gefunden, dass eine konstitutive Expression eines Bcl-2-Proteins zwar eine Resistenz gegen nekrotrophe Pilze bedingt, jedoch ein Brechen der mlo-vermittelten Resistenz gegen obligat-biotrophen Echten Mehltau (siehe Vergleichsversuch 1) zur Folge hat. Dies stellt den wirtschaftlichen Nutzen der im Stand der Technik beschriebenen Verfahren in Frage.

Es bestand die Aufgabe, Verfahren zur Pathogenabwehr in Pflanzen bereitzustellen, die eine effiziente Abwehr pflanzlicher Pathogene (bevorzugt nekrotropher Pathogene) ermöglichen, ohne eine ggf. bestehende Resistenz gegen andere Pathogene (wie beispielsweise biotrophe Pathogene) zu brechen. Diese Aufgabe wird durch das erfindungsgemäße Verfahren gelöst.

Ein erster Gegenstand der Erfindung betrifft Verfahren zur Erzeugung oder Erhöhung der Resistenz gegen mindestens einen biotischen oder abiotischen Streßfaktor in Pflanzen, wobei nachfolgende Arbeitsschritte umfaßt sind

5

- a) Erhöhung der Proteinmenge oder Funktion mindestens eines Bax Inhibitor-1 (BI1) Proteins in mindestens einem pflanzlichen Gewebe mit der Maßgabe, dass die Expression in der Blattepidermis im wesentlichen unverändert bleibt oder reduziert wird, und
- b) Auswahl der Pflanzen, bei denen im Vergleich zur Ausgangspflanze eine Resistenz gegen mindestens einen biotischen oder abiotischen Streßfaktor besteht oder erhöht ist.

10

15

Bevorzugt ist der biotische oder abiotische Streßfaktor ein Pathogen, besonders bevorzugt ein Pathogen ausgewählt aus der Gruppe der nekrotrophen und hemibiotrophen Pathogene.

20

Unter der Epidermis versteht der Fachmann das vorherrschende Abschlussgewebe primärer oberirdischer Pflanzenteile, so des Sprosses, der Blätter, Blüten, Früchte und Samen. Nach außen scheiden die Epidermiszellen eine wasserabstoßende Schicht, die Kutikula ab. Die Wurzeln sind von der Rhizodermis umgeben, welche der Epidermis in vieler Hinsicht ähnelt, jedoch auch markante Unterschiede zu ihr aufweist. Die Epidermis entsteht aus der äußersten Schicht des Apikalmeristems. Die Ableitung der Rhizodermis hingegen ist weniger klar. Je nach Art kann sie entwicklungsgeschichtlich entweder der Wurzelhaube oder der primären Rinde zugerechnet werden. Der Epidermis können zahlreiche Funktionen zugeschrieben werden: Sie bietet der Pflanze Schutz vor Austrocknung und regelt die Transpirationsrate. Sie schützt die Pflanze vor den verschiedensten chemischen und physikalischen Fremdeinflüssen sowie vor Tierfraß und Befall durch Parasiten. Sie ist am Gasaustausch, an der Sekretion bestimmter Stoffwechselprodukte und an der Absorption von Wasser beteiligt. In ihr sind Rezeptoren für Licht und mechanische Reize enthalten. Sie wirkt damit als ein Signalwandler zwischen Umwelt und Pflanze. Entsprechend den verschiedenen Funktionen enthält die Epidermis eine Anzahl unterschiedlich differenzierter Zellen. Hinzu kommen artspezifische Varianten und unterschiedliche Organisation der Epidermen in den einzelnen Teilen einer Pflanze. Im wesentlichen besteht sie aus drei Kategorien

25

30

35

40

von Zellen: den "eigentlichen" Epidermiszellen, den Zellen der Stomata (Spaltöffnungen) und den Trichomen (griech.: Trichoma, Haar), epidermalen Anhangsgebilden verschiedener Form, Struktur und Funktion.

- 5 Die "eigentlichen", d.h., die am wenigsten spezialisierten Epidermiszellen machen die Hauptmasse der Zellen des Abschluss-  
gewebes aus. Sie sind in der Aufsicht entweder polygonal (von  
10 platten- oder tafelförmiger Gestalt) oder gestreckt. Die  
zwischen ihnen ausgebildeten Wände sind vielfach gewellt oder  
gebuchtet. Wodurch diese Form während der Entwicklung induziert  
wird, ist unbekannt, die vorliegenden Hypothesen erklären den  
Sachverhalt nur unbefriedigend. Gestreckte Epidermiszellen  
15 findet man an Organen oder Organteilen, die selbst gestreckt  
sind, so z.B. an Stengeln, Blattstielen und Blattrippen sowie an  
den Blättern der meisten Monokotyledonen. Ober- und Unterseite  
von Blattspreiten können von unterschiedlich strukturierten  
Epidermen bedeckt sein wobei sowohl die Form der Zellen, die  
Dicke der Wände als auch die Verteilung und Zahl spezialisierter  
20 Zellen (Stomata und/oder Trichome) pro Flächeneinheit variieren  
kann. Große Variationen findet man auch innerhalb einzelner  
Familien, z. B. bei den Crassulaceen. Meist ist die Epidermis  
einschichtig, jedoch sind bei Arten aus mehreren Familien  
(Moraceae: hier die meisten Ficus-Arten, Piperaceae: Peperonia  
[Peperonie], Begoniaceae, Malvaceae u.a.) mehrschichtige  
25 wasserspeichernde Epidermen nachgewiesen worden. Epidermiszellen  
sondern nach außen eine Cutinschicht (Kutikula) ab, die als ein  
ununterbrochener Film alle epidermalen Oberflächen überzieht.  
Sie kann entweder glatt oder durch Vorwölbungen, Leisten, Falten  
und Furchen strukturiert sein. Doch nicht immer beruht eine  
30 durch Betrachtung der Oberfläche sichtbare Faltung der Kutikula  
auf der Ausbildung von Kutikularleisten. Es gibt durchaus Fälle,  
wo eine Kutikulafaltung nur der Ausdruck der darunterliegenden  
Ausstülpungen der Zellwand ist. Epidermale Anhangsgebilde  
verschiedener Form, Struktur und Funktion werden als Trichome  
35 bezeichnet und hierin ebenfalls unter dem Begriff „Epidermis“  
verstanden.. Sie treten als Schutz-, Stütz- und Drüsenhaare in  
Form von Schuppen, verschiedenen Papillen und bei Wurzeln als  
absorbierende Haare auf. An ihrer Bildung sind allein Epidermis-  
zellen beteiligt. Oft entsteht ein Trichom aus nur einer solchen  
40 Zelle, manchmal sind an der Entstehung mehrere beteiligt.  
Ebenfalls umfasst unter dem Begriff „Epidermis“ sind Papillen.  
Papillen sind Ausstülpungen der Epidermisoberfläche. Das Lehr-  
buchbeispiel hierfür sind die Papillen auf Blütenoberflächen des  
Stiefmütterchens (*Viola tricolor*) sowie die Blattoberflächen

- vieler Arten im tropischen Regenwald. Sie verleihen der Oberfläche eine samtartige Konsistenz. Einige Zellen von Epidermen können als Wasserspeicher ausgebildet sein. Ein typisches Beispiel stellen die Blasen­zellen an Oberflächen vieler Mittagsblumenarten und anderer Sukkulen­ten dar. Bei manchen Pflanzen, z.B. bei der Glockenblume (*Campanula persicifolia*) sind die Außenwände der Epidermis linsenförmig verdickt.
- 10 Die Hauptmasse aller Gewebe bildet das Grundgewebe oder Parenchym. Zu den parenchymatischen Geweben gehört das Mesophyll, das in Blättern in Palisadenparenchym und Schwammparenchym differenziert sein kann.
- 15 Folglich versteht der Fachmann unter Mesophyll ein parenchymatisches Gewebe. Parenchymatische Zellen sind durchweg lebend, meist isodiametrisch, seltener gestreckt. Das Mark der Sprosse, die Speichergewebe der Früchte, Samen, der Wurzel und anderer unterirdischer Organe sind ebenso als Parenchyme zu betrachten
- 20 wie das Mesophyll.

Das Mesophyll ist in den Blättern der meisten Farne und Phanerogamen, besonders ausgeprägt bei den Dikotyledonen und vielen Monokotyledonen, in Palisaden- und Schwammparenchym untergliedert. Ein "typisches" Blatt ist dorsiventral gebaut. Das Palisadenparenchym liegt dabei meist an der Blattoberseite unmittelbar unter der Epidermis. Das Schwammparenchym füllt den darunterliegenden Raum aus. Es ist von einem voluminösen Interzellularsystem durchsetzt, dessen Gasraum über die Spaltöffnungen in direktem Kontakt zur Außenwelt steht.

25 Das Palisadenparenchym besteht aus langgestreckten, zylindrischen Zellen. Bei einigen Arten sind die Zellen irregulär, gelegentlich sind sie gegabelt (Y-förmig: Armpalisadenparenchym). Solche Varianten kommen bei Farnen, Coniferen und einigen

30 wenigen Angiospermen (z.B. bei einigen Ranunculaceen- und Caprifoliaceenarten [Beispiel: Holunder]) vor. Neben der eben beschriebenen, am weitesten verbreiteten Organisationsform sind die folgenden Varianten nachgewiesen worden:

35 Palisadenparenchym an der Blattunterseite. Besonders auffällig bei Schuppenblättern. Beispiel: Lebensbaum (*Thuja*), sowie bei den Blättern des Bärlauchs (*Allium ursinum*).

40 Palisadenparenchym an beiden Blattseiten (Ober- und Unterseite). Häufig bei Pflanzen trockener Standorte (Xerophyten). Beispiel: Kompasspflanze (*Lactuca serriola*);

Ringförmig geschlossenes Palisadenparenchym: In zylindrisch organisierten Blättern und in Nadeln der Koniferen.

Die Variabilität der Schwammparenchymzellen und die Ausbildung  
5 des Schwammparenchyms selbst sind noch vielgestaltiger als die  
des Palisadenparenchyms. Es wird meist als Durchlüftungsgewebe  
bezeichnet, denn es enthält eine Vielzahl untereinander ver-  
bundener Interzellularen.

Das Mesophyll kann das so genannte Assimilationsgewebe umfassen,  
10 jedoch sind die Begriffe Mesophyll und Assimilationsgewebe nicht  
als Synonyme zu verwenden. Es gibt chloroplastenfreie Blätter,  
die sich in ihrem Aufbau nur unwesentlich von vergleichbaren,  
grünen Blättern unterscheiden. Folglich enthalten sie Mesophyll,  
doch eine Assimilation unterbleibt; umgekehrt findet eine  
15 Assimilation z.B. auch in Sproßabschnitten statt. Weitere  
Hilfsmittel zur Charakterisierung von Epidermis und Mesophyll  
findet der Fachmann z.B. in v. GUTTENBERG, H.: Lehrbuch der  
Allgemeinen Botanik. Berlin: Akademie-Verlag 1955 (5. Aufl.),  
HABERLANDT, G.: Physiologische Pflanzenanatomie. Leipzig: W.  
20 Engelmann 1924 (6. Aufl.); TROLL, W.: Morphologie der Pflanzen.  
Band 1: Vegetationsorgane. Berlin: Gebr. Borntraeger, 1937;  
TROLL, W.: Praktische Einführung in die Pflanzenmorphologie.  
Jena: VEB G. Thieme Verlag 1954/1957; TROLL, W., HÖHN, K.:  
Allgemeine Botanik. Stuttgart: F. Enke Verlag, 1973 (4. Aufl.)

25 In einer Ausführungsform wird die Epidermis biochemisch  
charakterisiert. Die Epidermis kann in einer Ausführungsform  
durch die Aktivität eines oder mehrerer der folgenden Promotoren  
gekennzeichnet werden:

- 30 - WIR5 (=GstA1), acc. X56012, Dudler & Schweizer, unveröff.
- GLP4, acc. AJ310534; Wei, Y.; Zhang, Z.; Andersen, C.H.;  
Schmelzer, E.; Gregersen, P.L.; Collinge, D.B.; Smedegaard-  
35 Petersen, V.; Thordal-Christensen, H. (1998) An  
epidermis/papilla-specific oxalate oxidase-like protein in  
the defence response of barley attacked by the powdery mildew  
fungus. *Plant Molecular Biology* 36, 101-112.
- 40 - GLP2a, acc. AJ237942, Schweizer, P., Christoffel, A. and  
Dudler, R. (1999). Transient expression of members of the  
germin-like gene family in epidermal cells of wheat confers  
disease resistance, *Plant J* 20, 541-552.

- Prx7, acc. AJ003141, Kristensen BK, Ammitzböll H, Rasmussen SK & Nielsen KA. 2001. Transient expression of a vacuolar peroxidase increases susceptibility of epidermal barley cells to powdery mildew. *Molecular Plant Pathology*, 2(6), 311-317
  - GerA, acc. AF250933 ; Wu S, Druka A, Horvath H, Kleinhofs A, Kannangara G & von Wettstein D, 2000. Functional characterization of seed coat-specific members of the barley germin gene family. *Plant Phys Biochem* 38, 685-698
  - OsROCl, acc. AP004656
  - RTBV, acc. AAV62708, AAV62707 ; Klöti, A, Henrich C, Bieri S, He X, Chen G, Burkhardt PK, Wünn J, Lucca, P, Hohn, T, Potrykus I & Fütterer J, 1999, Upstream and downstream sequence elements determine the specificity of the rice tungro bacilliform virus promoter and influence RNA production after transcription initiation. *PMB* 40, 249-266
- In einer Ausführungsform wird die Epidermis dadurch gekennzeichnet, dass alle genannten Promoter in dem Gewebe oder der Zelle aktiv sind. In einer anderen Ausführungsform wird die Epidermis dadurch gekennzeichnet, dass nur ein Teil der Promotoren aktiv ist, z.B. 2, 3, 5 oder 7 oder mehr, mindestens jedoch einer der oben aufgezählten.
- In einer Ausführungsform wird das Mesophyll biochemisch charakterisiert. Das Mesophyll kann in einer Ausführungsform durch die Aktivität eines oder mehrerer der folgenden Promotoren gekennzeichnet werden:
- PPCZm1 (=PEPC); Kausch, A.P., Owen, T.P., Zachwieja, S.J., Flynn, A.R. and Sheen, J. (2001) Mesophyll-specific, light and metabolic regulation of the C(4)PPCZm1 promoter in transgenic maize. *Plant Mol. Biol.* 45, 1-15
  - Osrbcs, Kyojuka et al *Plant Phys*: 1993 102: Kyojuka J, McElroy D, Hayakawa T, Xie Y, Wu R & Shimamoto K. 1993. Light-regulated and cell-specific expression of tomato rbcsgusA and rice rbcsgusA fusion genes in transgenic rice. *Plant Phys* 102, 991-1000

- OsPPDK, acc. AC099041, unveröff.
- 5 - TaGF-2.8, acc. M63223; Schweizer, P., Christoffel, A. and Dudler, R. (1999). Transient expression of members of the germin-like gene family in epidermal cells of wheat confers disease resistance, Plant J 20, 541-552.
- TaFBPase, acc. X53957; unveröff.
- 10 - TaWIS1, acc. AF467542; US 200220115849
- HvBIS1, acc. AF467539; US 200220115849
- ZmMIS1, acc. AF467514; US 200220115849
- 15 - HvPR1a, acc. X74939 ; Bryngelsson et al. Molecular Plant-Microbe Interactions (1994)
- HvPR1b, acc. X74940; Bryngelsson et al. Molecular Plant-Microbe Interactions (1994)
- 20 - HvB1,3gluc; acc. AF479647; unveröff.
- HvPrx8, acc. AJ276227; Kristensen et al MPP 2001 (siehe oben)
- HvPAL, acc. X97313 ; Wei, Y.; Zhang, Z.; Andersen, C.H.; Schmelzer, E.; Gregersen, P.L.; Collinge, D.B.; Smedegaard-Petersen, V.; Thordal-Christensen, H. (1998) An
- 25 epidermis/papilla-specific oxalate oxidase-like protein in the defence response of barley attacked by the powdery mildew fungus. Plant Molecular Biology 36, 101-112.
- 30 In einer Ausführungsform wird das Mesophyll dadurch gekennzeichnet, dass alle genannten Promöter in dem Gewebe oder der Zelle aktiv sind. In einer anderen Ausführungsform wird das Mesophyll dadurch gekennzeichnet, dass nur ein Teil der
- Promotoren aktiv ist, z.B. 2, 3, 5 oder 7 oder mehr, mindestens
- 35 jedoch einer der oben aufgezählten.

In einer Ausführungsform sind in einer erfindungsgemäß verwendeten oder hergestellten Pflanze oder in einer erfindungsgemäßen Pflanze in der Epidermis und im Mesophyll alle genannten

40 Promotoren aktiv. In einer Ausführungsform sind nur ein Teil der genannten Promotoren aktiv, z.B. 2, 5, 7 oder mehr, mindestens ist jedoch einer der oben aufgezählten Promotoren jeweils aktiv.



- In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Proteinmenge oder Funktion des BI1-Proteins wurzel-, knollen- oder mesophyll-spezifisch, besonders bevorzugt mesophyll-spezifisch, beispielsweise durch rekombinante Expression einer für besagtes BI1-Protein kodierenden Nukleinsäuresequenz unter Kontrolle eines wurzel-, knollen- oder mesophyll-spezifischen Promotors, bevorzugt unter Kontrolle eines mesophyll-spezifischen Promotors.
- 10 In einer Ausführungsform wird wie hierin beschrieben, die Expression oder Funktion des erfindungsgemäßen Proteins bzw. des hierin charakterisierten BI-1 im Mesophyll einer Pflanze erhöht. Eine Erhöhung der Expression kann wie unten beschrieben erreicht werden. Unter Erhöhung der Expression oder Funktion wird hierin
- 15 sowohl die Aktivierung oder Steigerung der Expression oder Funktion des endogenen Proteins einschließlich einer *de novo* Expression als auch eine Erhöhung oder Steigerung durch die Expression eines transgenen Proteins oder Faktors verstanden.
- 20 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform kann die Erhöhung der Proteinmenge oder Funktion mindestens eines pflanzlichen BI1-Proteins kombiniert werden mit einem mlo-resistenten Phänotyp oder mit der Inhibierung oder Reduzierung im Vergleich zu einer Kontrollpflanze der Expression von MLO, RacB und/oder NaOx
- 25 in der Pflanze oder einem Teil davon, z.B. in einem Gewebe, besonders vorteilhaft jedoch mindestens in der Epidermis oder einem wesentlichen Teil der Epidermiszellen und/oder mit der Erhöhung der Expression oder Funktion von PEN2 und/oder PEN1 in der Pflanze, z.B. konstitutiv, oder einem Teil davon, z.B. in
- 30 einem Gewebe, besonders vorteilhaft jedoch mindestens in der Epidermis oder einem wesentlichen Teil der Epidermiszellen wird, mit der Maßgabe, dass die Expression eines pflanzlichen BI1-Proteins in der Blattepidermis im wesentlichen unverändert bleibt oder reduziert wird und so eine kombinierte Resistenz
- 35 gegen sowohl nekrotrophe als auch biotrophe Pathogene erreicht wird.

In Gerste ist der Mlo-Locus als negativer Regulator der Pathogenabwehr beschrieben. Der Verlust oder Funktionsverlust ("loss-of-function") des Mlo-Gens bedingt eine erhöhte, rassen-unspezifische Resistenz gegen zahlreiche Mehltauisolate (Büschges R

40

et al. (1997) Cell 88:695-705; Jorgensen JH (1977) Euphytica 26:55-62; Lyngkjaer MF et al. (1995) Plant Pathol 44:786-790). Das Mlo-Gen ist beschrieben (Büschges R et al. (1997) Cell 88:695-705; WO 98/04586; Schulze-Lefert P, Vogel J (2000) Trends Plant Sci. 5:343-348). Verschiedene Mlo-Homologe aus anderen Getreidearten wurden isoliert.

Ein mlo-resistenter Phänotyp kann wie im Stand der Technik beschrieben erreicht werden. Verfahren unter Verwendung dieser Gene zum Erzielen einer Pathogenresistenz sind beschrieben u.a. in WO 98/04586; WO 00/01722; WO 99/47552.

Vorteilhaft kann in einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung die Aktivität, Expression oder Funktion von MLO, RacB und/oder NaOx in der Pflanze oder einem Teil davon, z.B. in einem Gewebe, besonders vorteilhaft jedoch mindestens in der Epidermis oder einem wesentlichen Teil der Epidermiszellen inhibiert oder im Vergleich zu einer Kontrollpflanze oder einem Teil davon reduziert werden. Durch die Reduzierung der Aktivität oder Funktion von MLO, RacB und/oder NaOx in der Pflanze oder einem Teil davon, z.B. in einem Gewebe, besonders vorteilhaft jedoch mindestens in der Epidermis oder einem wesentlichen Teil der Epidermiszellen wird vorzugsweise die Resistenz oder Widerstandskraft gegen biotrophe Pathogene bei erfindungsgemäß hergestellten Pflanzen erhöht. In Kombination mit einer Reduktion oder Unterdrückung des nekrotischen Zelltods ist dies besonders vorteilhaft. Die Aktivität oder Funktion von MLO, RacB und/oder NaOX kann analog wie für MLO in WO 98/04586; WO 00/01722; WO 99/47552 und den weiteren unten genannten Schriften beschrieben reduziert oder inhibiert werden, deren Inhalt hiermit ausdrücklich als mit aufgenommen gilt, insbesondere um die Aktivität und Inhibierung von MLO zu beschreiben. Die Beschreibung der genannten Schriften beschreibt Verfahren Methoden und besonders bevorzugte Ausführungsformen zur Erniedrigung oder Inhibierung der Aktivität oder Funktion von MLO, die Beispiele geben konkret an, wie dies ausgeführt werden kann.

Die Reduzierung der Aktivität oder Funktion, ggf. der Expression von RacB ist in der WO 2003020939 ausführlich beschrieben, die hiermit ausdrücklich mit als in die vorliegenden Beschreibung mit aufgenommen gilt. Die Beschreibung der genannten Schrift beschreibt Verfahren und Methoden zur Erniedrigung oder Inhi-

- bierung der Aktivität oder Funktion von BI-1, die Beispiele geben konkret an, wie dies ausgeführt werden kann. Besonders bevorzugt wird die Reduktion oder Inhibierung der Aktivität oder Funktion von RacB gemäß den in der WO 2003020939 besonders bevorzugten Ausführungsformen und den Beispielen und in den dort als besonders bevorzugt dargestellten Organismen durchgeführt, insbesondere in einer Pflanze oder einem Teil davon, z.B. in einem Gewebe, besonders vorteilhaft jedoch mindestens in der Epidermis oder einem wesentlichen Teil der Epidermiszellen. Die Reduzierung der Aktivität oder Funktion, ggf. der Expression von RacB ist in der WO 2003020939 ausführlich beschrieben. Der Fachmann findet in der WO 2003020939 die Sequenzen, die für RacB Proteine codieren und kann mit dem in der WO 2003020939 zur Verfügung gestellten Verfahren auch RacB identifizieren.
- Die Reduzierung der Aktivität oder Funktion, ggf. der Expression von NaOX ist in der PCT/EP/03/07589 ausführlich beschrieben, die hiermit ausdrücklich mit als in die vorliegenden Beschreibung mit aufgenommen gilt.. Die Beschreibung der genannten Schrift beschreibt Verfahren und Methoden zur Erniedrigung oder Inhibierung der Aktivität oder Funktion von NaOx, die Beispiele geben konkret an, wie dies ausgeführt werden kann. Besonders bevorzugt wird die Reduktion oder Inhibierung der Aktivität oder Funktion von NaOx gemäß den in der PCT/EP/03/07589 besonders bevorzugten Ausführungsformen und den Beispielen und in den dort als besonders bevorzugt dargestellten Organismen durchgeführt insbesondere in einer Pflanze oder einem Teil davon, z.B. in einem Gewebe, besonders vorteilhaft jedoch mindestens in der Epidermis oder einem wesentlichen Teil der Epidermiszellen. Der Fachmann findet in der PCT/EP/03/07589 die Sequenzen, die für NaOx Proteine codieren und kann mit dem in der PCT/EP/03/07589 zur Verfügung gestellten Verfahren auch NaOx identifizieren.

- Vorteilhaft kann in einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung die Aktivität, Expression oder Funktion von PEN1, PEN2 und/oder SNAP34 in der Pflanze, z.B. konstitutiv, oder einem Teil davon, z.B. in einem Gewebe, besonders vorteilhaft jedoch mindestens in der Epidermis oder einem wesentlichen Teil der Epidermiszellen erhöht werden. Die Erhöhung der Aktivität, die auch eine de novo Expression umschließt, von PEN1, PEN2 und/oder SNAP 34 in der Pflanze, z.B. konstitutiv, oder einem Teil davon,

z.B. in einem Gewebe, besonders vorteilhaft jedoch mindestens in der Epidermis oder einem wesentlichen Teil der Epidermiszellen wird vorzugsweise die Resistenz oder Widerstandskraft gegen biotrophe Pathogene bei erfindungsgemäß hergestellten Pflanzen erhöhen. In Kombination mit einer Reduktion oder Unterdrückung des nekrotischen Zelltods ist dies besonders vorteilhaft. Die Erhöhung der Aktivität oder Funktion, ggf. der Expression von PEN2 ist in der WO03074688 ausführlich beschrieben und die hiermit ausdrücklich als in der vorliegenden Beschreibung mit aufgenommen gilt. Die Beschreibung der genannten Schrift beschreibt Verfahren und Methoden zur Erniedrigung oder Inhibierung der Aktivität oder Funktion von PEN2, die Beispiele geben konkret an, wie dies ausgeführt werden kann. Besonders bevorzugt wird die Reduktion oder Inhibierung der Aktivität oder Funktion von PEN2 gemäß den in der WO03074688 besonders bevorzugten Ausführungsformen und den Beispielen und in den dort als besonders bevorzugt dargestellten Organismen durchgeführt, insbesondere in Pflanzen, z.B. konstitutiv, oder einem Teil davon, z.B. in einem Gewebe, besonders vorteilhaft jedoch mindestens in der Epidermis oder einem wesentlichen Teil der Epidermiszellen. Der Fachmann findet in der WO03074688 die Sequenzen, die für PEN2 Proteine codieren und kann mit dem in der WO03074688 zur Verfügung gestellten Verfahren auch PEN2 identifizieren. Die Expression von PEN1 und SNAP34 kann analog zu den in der WO03074688 beschriebenen Verfahren erhöht werden. Der Fachmann kann aufgrund des allgemeinen Fachwissens und des ihm bekannten Stands der Technik PEN1 und SNAP34-Nukleinsäuresequenzen und -Proteinsequenzen isolieren und überexprimieren. Seq ID NO.: 39 beschreibt die Nukleinsäuresequenz, die für PEN1 aus Gerste kodiert, die Proteinsequenz ist in Seq ID No.: 40 beschrieben. Seq ID NO.: 41 beschreibt die Nukleinsäuresequenz, die für PEN1 aus *Arabidopsis thaliana* kodiert, die Proteinsequenz ist in Seq ID No.: 42 beschrieben. PEN1 aus *Arabidopsis thaliana* ist veröffentlicht unter den accession numbers NM 202559 und NM 112015. Das Homolog aus Gerste wird als ROR2 offenbart in accession numbers AY246907 und AY246906. Es handelt sich um Mitglieder der recht großen Syntaxin-Proteinfamilie. Der Fachmann kann somit durch einfache Homologievergleiche weitere Syntaxin-Proteine identifizieren, die als potentielle Resistenzgene in dem erfindungsgemäßen Verfahren exprimiert werden.

Seq ID NO.: 43 beschreibt die Nukleinsäuresequenz, die für SNAP34 aus Gerste kodiert, die Proteinsequenz ist in Seq ID No.: 44 beschrieben. Das SNAP-34 Homolog aus Gerste ist auch

veröffentlicht unter AY 247208 (SNAP-34). Homologe unbekannter Funktion, die eine Rolle in der Resistenz spielen könnten, sind veröffentlicht unter AY 247209 (SNAP-28) und AY 247210 (SNAP-25). Folgende Arabidopsis-Gene zeigen eine höhere Homologie zu Gerste SNAP34 als Gersten SNAP-28 bzw. SNAP-25 zu SNAP-34 und können somit als potentielle Resistenz-vermittelnde Gene vorteilhaft coüberexprimiert werden:

- AAM 62553 - Arabidopsis SNAP25a
- NP 200929 - Arabidopsis SNAP33b
- 10 NP 172842 - Arabidopsis SNAP30
- NP 196405 - Arabidopsis SNAP29

Folglich betrifft die Erfindung auch eine Pflanze, in der mindestens weiterhin in der Epidermis ein Polypeptide überexprimiert wird, das codiert wird von einem Nukleinsäuremolekül, das die in Seq. ID No.: 39, 41 oder 43 oder eine der in den genannten Datenbankveröffentlichungen gezeigten Sequenzen umfasst oder das die in Seq. ID No.: 40, 42 oder 44 gezeigte oder eine der in den genannten Datenbankveröffentlichungen gezeigten Aminosäuresequenzen umfasst, oder das ein funktionelles Äquivalent davon ist oder das eine Homologie von mindestens 50 %, bevorzugt 70 %, mehr bevorzugt 80 %, noch mehrbevorzugt 90 % oder mehr zu den genannten Sequenzen auf Ebene des codierenden Nukleinsäuremoleküls oder bevorzugt auf Aminosäureebene hat, oder eine Pflanze, in der konstitutiv oder in einem Teil, z.B. in einem Gewebe, besonders vorteilhaft jedoch mindestens in der Epidermis oder einem wesentlichen Teil der Epidermiszellen das vorhergehend charakterisierte Polypeptide aktiviert wird oder dessen Aktivität oder Funktion erhöht wird.

Eine Reduktion oder Expression oder Aktivität kann durch dem Fachmann geläufige Verfahren bewirkt werden, z.B. Mutagenese, z.B. EMS, ggf. Tilling, iRNA; Ribozyme, Silencing, Knockout, etc. Verfahren zur Reduzierung sind insbesondere beschrieben in WO 2003020939, dessen Methoden an die hierin beschriebenen Sequenzen leicht angepasst werden können. Daher wird der Inhalt der WO 2003020939 explizit hierin mit aufgenommen.

Die Reduzierung oder Verminderung der Expression eines BI-1-Proteins, der BI-1-Aktivität oder der BI-1-Funktion kann auf vielfältige Art und Weise realisiert werden.

„Reduzierung“, „reduzieren“, „Verminderung“ oder „vermindern“ ist im Zusammenhang mit einem BI-1 Protein, einer BI-1 Aktivität

oder BI-1-Funktion weit auszulegen und umfasst die teilweise oder im wesentlichen vollständige, auf unterschiedliche zell-biologische Mechanismen beruhende Unterbindung oder Blockierung der Funktionalität eines BI-1-Proteins.

- 5 Eine Verminderung im Sinne der Erfindung umfasst auch eine mengenmäßige Verringerung eines BI-1-Proteins bis hin zu einem im wesentlichen vollständigen Fehlen des BI-1-Proteins (d.h. fehlende Nachweisbarkeit von BI-1-Aktivität bzw. BI-1-Funktion oder fehlende immunologische Nachweisbarkeit des BI-1-Proteins).
- 10 Dabei wird die Expression eines bestimmten BI-1-Proteins oder die BI-1-Aktivität bzw. BI-1-Funktion in einer Zelle oder einem Organismus bevorzugt um mehr als 50 %, besonders bevorzugt um mehr als 80 %, ganz besonders bevorzugt um mehr als 90 % vermindert.

- 15 Erfindungsgemäß sind verschiedene Strategien zur Verminderung der Expression eines BI-1-Proteins, der BI-1-Aktivität oder BI-1-Funktion umfasst. Der Fachmann erkennt, dass eine Reihe verschiedener Methoden zur Verfügung stehen, um die Expression
- 20 eines BI-1-Proteins, die BI-1-Aktivität oder die BI-1-Funktion in gewünschter Weise zu beeinflussen.

- Eine Verminderung der BI-1-Aktivität oder der BI-1-Funktion wird bevorzugt durch eine verminderte Expression eines endogenen
- 25 BI-1-Proteins erreicht.

- Eine Verminderung der BI-1-Proteinmenge, BI-1-Aktivität oder BI-1-Funktion kann unter Verwendung nachfolgender Verfahren realisiert werden:

- 30
- a) Einbringung einer doppelsträngigen BI-1 RNA-Nukleinsäuresequenz (BI-1-dsRNA) oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette oder Expressionskassetten;
- 35 b) Einbringung einer BI-1 antisense-Nukleinsäuresequenzen oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette. Umfasst sind solche Verfahren, bei denen die antisense-Nukleinsäuresequenz gegen ein BI-1-Gen (also genomische DNA-Sequenzen) oder ein BI-1-Gentranskript (also RNA-Sequenzen)
- 40 gerichtet ist. Umfasst sind auch  $\alpha$ -anomere Nukleinsäuresequenzen.

- c) Einbringung einer BI-1 antisense-Nukleinsäuresequenzen kombiniert mit einem Ribozym oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette.
- 5 d) Einbringung von BI-1 sense-Nukleinsäuresequenzen zur Induktion einer Kosuppression oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette.
- 10 e) Einbringung einer Nukleinsäuresequenz kodierend für dominant-negatives BI-1 Protein oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette.
- 15 f) Einbringung DNA-oder Protein-bindende Faktoren gegen BI-1 - Gene, -RNAs oder -Proteine oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette.
- 20 g) Einbringung von den BI-1 RNA-Abbau bewirkende virale Nukleinsäuresequenzen und Expressionskonstrukten oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette.
- h) Einbringung von Konstrukten zur Induktion einer homologen Rekombination an endogenen BI-1-Genen beispielsweise zur Erzeugung von Knockout-Mutanten.
- 25 i) Einführung von Mutationen in endogenen BI-1 Gene zur Erzeugung eines Funktionsverlustes (z.B. Generierung von Stopp-Kodons, Verschiebungen im Leseraster etc.)

30 wobei jedes der genannten Verfahren Epidermis-spezifisch durchgeführt werden muss, d.h. die Expression im Epidermisgewebe bleibt unverändert oder wird reduziert. Dabei kann jedes einzelne dieser Verfahren eine Verminderung der BI-1-Expression, BI-1-Aktivität oder BI-1-Funktion im Sinne der Erfindung bewirken. Auch eine kombinierte Anwendung ist denkbar. Weitere  
35 Methoden sind dem Fachmann bekannt und können die Behinderung oder Unterbindung der Prozessierung des BI-1-Proteins, des Transports des BI-1-Proteins oder dessen mRNA, Hemmung der Ribosomenanlagerung, Hemmung des RNA-Spleißens, Induktion eines BI-1-RNA abbauenden Enzyms und/oder Hemmung der Translations-  
40 elongation oder -termination umfassen.

Die Epidermis-sepzipfische Reduktion kann z.B. durch eine transiente Anwendung der genannten Verfahren auf Epidermiszellen oder durch eine spezifische Transformation von im wesentlichen

nur Epidermiszellen oder durch eine Expressionskontrolle der aufgeführten Konstrukte unter einem Epidermisspezifischen Promoter oder sonstigen epidermisspezifischen Kontrollelement erfolgt.

5

Die einzelnen bevorzugten Verfahren seien infolge kurz beschrieben:

- 10 a) Einbringung eines doppelsträngigen BI-1 RNA-Nukleinsäuremoleküls (BI-1-dsRNA)

Das Verfahren der Genregulation mittels doppelsträngiger RNA ("double-stranded RNA interference"; dsRNAi) ist vielfach in tierischen und pflanzlichen Organismen beschrieben (z.B. Matzke MA et al. (2000) Plant Mol Biol 43:401-415; Fire A. et al (1998) Nature 391:806-811; WO 99/32619; WO 99/53050; WO 00/68374; WO 00/44914; WO 00/44895; WO 00/49035; WO 00/63364). Auf die in den angegebenen Zitaten beschriebenen Verfahren und Methoden wird ausdrücklich Bezug genommen. Eine effiziente Gensuppression kann auch bei transienter Expression oder nach transienter Transformation beispielsweise infolge einer biolistischen Transformation gezeigt werden (Schweizer P et al. (2000) Plant J 2000 24: 895-903). dsRNAi-Verfahren beruhen auf dem Phänomen, dass durch gleichzeitiges Einbringen von komplementären Strang- und Gegenstrang eines Gentranskriptes eine hoch-effiziente Unterdrückung der Expression des entsprechenden Gens bewirkt wird. Der bewirkte Phänotyp kommt dem einer entsprechenden knock-out Mutanten sehr ähnlich (Waterhouse PM et al. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95:13959-64).

Das dsRNAi-Verfahren hat sich bei der Verminderung der Expression als besonders effizient und vorteilhaft erwiesen. Wie u.a. in WO 99/32619 beschrieben sind dsRNAi-Ansätze klassischen antisense-Ansätzen deutlich überlegen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung bezieht sich daher auf doppelsträngige RNA-Moleküle (dsRNA-Moleküle), die bei Einführung in eine Pflanze (oder eine davon abgeleitete Zelle, Gewebe, Organen, insbesondere Blattepidermis) die Verminderung eines BI-1 bewirken.

40



Das doppelsträngiges RNA-Molekül zur Verminderung der Expression eines BI-1 Proteins ist dadurch gekennzeichnet, dass

- 5 a) einer der beiden RNA Stränge im wesentlichen identisch ist zu zumindest einem Teil einer BI-1-Nukleinsäuresequenz, und
- 10 b) der jeweils andere RNA Strang im wesentlichen identisch ist zu zumindest einem Teil des identisch ist zu zumindest einem Teil des komplementärenren Stranges einer BI-1 Nukleinsäuresequenz eines BI-1-Nukleinsäuresequenz.
- 15 In einer weiterhin bevorzugten Ausführungsform umfasst das doppelsträngige RNA-Molekül zur Verminderung der Expression eines BI-1 Proteins
- 20 a) einen "sense"-RNA-Strang umfassend mindestens eine Ribonukleotidsequenz, die im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil des "sense"-RNA-Transkriptes einer Nukleinsäuresequenz kodierend für ein BI-1 Protein, und
- 25 b) einen "antisense"-RNA-Strang, der zu dem RNA-sense-Strang unter a) im wesentlichen - bevorzugt vollständig - komplementären ist.

30 In Bezug auf die doppelsträngigen RNA-Moleküle meint BI-1-Nukleinsäuresequenz bevorzugt eine Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33 oder 38 oder ein funktionelles Äquivalent derselben.

35 „Im wesentlichen identisch“ meint, dass die dsRNA Sequenz auch Insertionen, Deletionen sowie einzelne Punktmutationen im Vergleich zu der BI-1 Zielsequenz aufweisen kann und dennoch eine effizient Verminderung der Expression bewirken. Bevorzugt beträgt die Homologie nach obiger Definition mindestens 50 % oder 75 %, bevorzugt mindestens 80 %, ganz besonders bevorzugt mindestens 90 % am meisten bevorzugt 100 % zwischen dem "sense"-Strang einer inhibitorischen dsRNA und einem Teilabschnitt einer BI-1 Nukleinsäuresequenz (bzw. zwischen dem "antisense"-Strang dem komplementären Strang einer BI-1 Nukleinsäuresequenz).

40

Die Länge des Teilabschnittes beträgt mindestens 10 Basen, bevorzugt mindestens 25 Basen, besonders bevorzugt mindestens 50 Basen, ganz besonders bevorzugt mindestens 100 Basen, am meisten bevorzugt mindestens 200 Basen oder mindestens 300 Basen. Alternativ, kann eine "im wesentlichen identische" dsRNA auch als Nukleinsäuresequenz definiert werden, die befähigt ist, mit einem Teil eines BI-1 Gen-transkriptes zu hybridisieren (z.B. in 400 mM NaCl, 40 mM PIPES pH 6,4, 1 mM EDTA bei 50°C oder 70°C für 12 bis 16 h).

"Im wesentlichen komplementär" meint, dass der "antisense"-RNA-Strang auch Insertionen, Deletionen sowie einzelne Punktmutationen im Vergleich zu dem Komplement des "sense"-RNA-Stranges aufweisen kann. Bevorzugt beträgt die Homologie mindestens 80 %, bevorzugt mindestens 90 %, ganz besonders bevorzugt mindestens 95 %, am meisten bevorzugt 100 % zwischen dem "antisense"-RNA-Strang und dem Komplement des "sense"-RNA-Strangs.

"Teil des "sense"-RNA-Transkriptes" einer Nukleinsäuresequenz kodierend für ein BI-1 Protein oder ein funktionelles Äquivalent desselben meint Fragmente einer RNA oder mRNA transkribiert von einer für ein BI-1-Protein oder ein funktionelles Äquivalent desselben kodierenden Nukleinsäuresequenz, bevorzugt von einem BI-1-Gen. Dabei haben die Fragmente bevorzugt eine Sequenzlänge von mindestens 20 Basen, bevorzugt mindestens 50 Basen, besonders bevorzugt mindestens 100 Basen, ganz besonders bevorzugt mindestens 200 Basen, am meisten bevorzugt mindestens 500 Basen. Umfasst ist auch die vollständige transkribierte RNA oder mRNA.

Umfasst ist auch die Verwendung der erfindungsgemäßen dsRNA-Moleküle in den erfindungsgemäßen Verfahren zur Erzeugung einer Pathogenresistenz in Pflanzen.

Die dsRNA kann aus einem oder mehr Strängen polymerisierter Ribonukleotide bestehen. Es können ferner Modifikationen sowohl des Zucker-Phosphat-Gerüsts als auch der Nukleoside vorliegen. Beispielsweise können die Phosphodiesterbindungen der natürlichen RNA dahingehend modifiziert sein, dass sie zumindest ein Stickstoff oder Schwefel-Heteroatom umfassen. Basen können dahingehend modifiziert werden, dass die

Aktivität beispielsweise von Adenosindeaminase eingeschränkt wird. Solche und weitere Modifikationen sind weiter unten bei den Verfahren zur Stabilisierung von antisense-RNA beschrieben.

5

Natürlich können, um den gleichen Zweck zu erreichen, auch mehrere individuelle dsRNA Moleküle, die jeweils einen der oben definierten Ribonukleotidsequenzabschnitte umfassen, in die Zelle oder den Organismus eingebracht werden.

10

Die dsRNA kann enzymatisch oder ganz oder teilweise chemisch-synthetisch hergestellt werden.

15

Die doppelsträngige dsRNA Struktur kann ausgehend von zwei komplementären, separaten RNA-Strängen oder - bevorzugt - ausgehend von einem einzelnen, selbstkomplementären RNA-Strang gebildet werden.

20

Die doppelsträngige Struktur kann ausgehend von einem einzelnen, selbstkomplementären Strang oder ausgehend von zwei komplementären Strängen gebildet werden. Bei einem einzelnen, selbstkomplementären Strang, können "sense"- und "antisense"-Sequenz durch eine verbindende Sequenz ("Linker") verknüpft sein und beispielsweise eine Haarnadelstruktur ausbilden. Bevorzugt kann die verbindende Sequenz ein Intron sein, das nach Synthese der dsRNA herausgespleißt wird. Die Nukleinsäuresequenz kodierend für eine dsRNA kann weitere Elemente beinhalten, wie beispielsweise Transkriptionsterminationssignale oder Polyadenylierungssignale.

25

30

Sollen die zwei Stränge der dsRNA in einer Zelle oder Pflanze zusammengebracht werden, so kann dies auf verschiedene Art geschehen:

35

Die Nukleinsäuresequenz kodierend für eine dsRNA kann weitere Elemente beinhalten, wie beispielsweise Transkriptionsterminationssignale oder Polyadenylierungssignale.

Sollen die zwei Stränge der dsRNA in einer Zelle oder Pflanze zusammengebracht werden, so kann dies auf verschiedene Art geschehen:

- 5       a) Transformation der Zelle oder Pflanze mit einem Vektor, der beide Expressionskassetten umfasst,
- b) Kotransformation der Zelle oder Pflanze mit zwei Vektoren, wobei der eine die Expressionskassetten mit dem "sense"-Strang, der andere die Expressionskassetten mit dem "antisense"-Strang umfasst.
- 10       c) Kreuzung von zwei Pflanzen, die mit jeweils einem Vektor transformiert wurden, wobei der eine die Expressionskassetten mit dem "sense"-Strang, der andere die Expressionskassetten mit dem "antisense"-Strang umfasst.
- 15

20       Die Bildung der RNA Duplex kann entweder außerhalb der Zelle oder innerhalb derselben initiiert werden. Wie in WO 99/53050 kann die dsRNA auch eine Haarnadelstruktur umfassen, indem "sense"- und "antisense"-Strang durch einen "Linker" (beispielsweise ein Intron) verbunden werden. Die selbstkomplementären dsRNA-Strukturen sind bevorzugt, da sie lediglich die Expression eines Konstruktes erfordern und die komplementären Stränge stets in einem äquimolaren Verhältnis umfassen.

25       

30       Die Expressionskassetten kodierend für den "antisense"- oder "sense"-Strang einer dsRNA oder für den selbstkomplementären-Strang der dsRNA, werden bevorzugt in einen Vektor insertiert und mit den unten beschriebenen Verfahren stabil (beispielsweise unter Verwendung von Selektionsmarkern) in das Genom einer Pflanze insertiert unter Kontrolle eines Epidermisspezifischen Promoters wie hierin aufgeführt, um eine dauerhafte Expression der dsRNA in der Epidermis zu gewährleisten.

35       

40       Die dsRNA kann unter Verwendung einer Menge eingeführt werden, die zumindest ein Kopie pro Zelle ermöglicht. Höhere Mengen (z.B. mindestens 5, 10, 100, 500 oder 1000 Kopien pro Zelle) können ggf. eine effizienter Verminderung bewirken.

Wie bereits beschrieben, ist eine 100%ige Sequenzidentität zwischen dsRNA und einem BI-1 Gentranskript oder dem Gentranskript eines funktionell äquivalenten Gens nicht zwingend erforderlich, um eine effiziente Verminderung der BI-1 Expression zu bewirken. Demzufolge besteht der Vorteil, dass das Verfahren tolerant ist gegenüber Sequenzabweichungen, wie sie infolge genetischer Mutationen, Polymorphismen oder evolutionärer Divergenzen vorliegen können. So ist es beispielsweise möglich mit der dsRNA, die ausgehend von der BI-1 Sequenz des einen Organismus generiert wurde, die BI-1 Expression in einem anderen Organismus zu unterdrücken. Die hohe Sequenzhomologie zwischen den BI-1 Sequenzen aus Reis, Mais und Gerste lässt auf einen hohen Konservierungsgrad dieses Proteins innerhalb von Pflanzen schließen, so dass die Expression einer dsRNA abgeleitet von einer der offenbarten BI-1 Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 1, 3 oder 5 auch einen vorteilhaften Effekt in anderen Pflanzenarten haben dürfte.

Auch ist es aufgrund der hohen Homologie zwischen den einzelnen BI-1-Proteinen und ihren funktionellen Äquivalenten möglich mit einer einzigen dsRNA, die ausgehend von einer bestimmten BI-1-Sequenz eines Organismus generiert wurde, die Expression weiterer homologer BI-1-Proteine und/oder deren funktioneller Äquivalente des gleichen Organismus oder aber auch die Expression von BI-1-Proteinen in anderen verwandten Arten zu unterdrücken. Zu diesem Zweck umfasst die dsRNA bevorzugt Sequenzbereich von BI-1-Gentranskripten, die konservierten Bereichen entsprechen. Besagte konservierte Bereiche können aus Sequenzvergleichen leicht abgeleitet werden.

Die dsRNA kann entweder in vivo oder in vitro synthetisiert werden. Dazu kann eine DNA-Sequenz kodierend für eine dsRNA in eine Expressionskassette unter Kontrolle mindestens eines genetischen Kontrollelementes (wie beispielsweise Promotor, Enhancer, Silencer, Splice-Donor oder -Akzeptor, Polyadenylierungssignal) gebracht werden, wobei eine Epidermisspezifische Expression der dsRNA angestrebt wird. Entsprechend vorteilhafte Konstruktionen sind weiter unten beschrieben. Eine Polyadenylierung ist nicht erforderlich, ebenso müssen keine Elemente zur Initiierung einer Translation vorhanden sein.

Eine dsRNA kann chemisch oder enzymatisch synthetisiert werden. Dazu können zelluläre RNA Polymerasen oder Bakteriophagen RNA Polymerasen (wie z.B. T3-, T7- oder SP6 RNA-Polymerase) verwendet werden. Entsprechende Verfahren zu  
5 in vitro Expression von RNA sind beschrieben (WO 97/32016; US 5,593,874; US 5,698,425, US 5,712,135, US 5,789,214, US 5,804,693). Eine chemisch oder enzymatisch in vitro syntetisierte dsRNA kann vor der Einführung in eine Zelle, Gewebe oder Organismus aus dem Reaktionsgemisch beispielsweise durch Extraktion, Präzipitation, Elektrophorese,  
10 Chromatographie oder Kombinationen dieser Verfahren ganz oder teilweise aufgereinigt werden. Die dsRNA kann unmittelbar in die Zelle eingeführt werden oder aber auch extrazellulär (z.B. in den interstitialen Raum) appliziert  
15 werden.

Bevorzugt wird die Pflanze jedoch stabil mit einem Expressionskonstrukt, das die Expression der dsRNA in der Epidermis realisiert, transformiert. Entsprechende Verfahren  
20 sind weiter unten beschrieben.

b) Einbringung eines BI-1 antisense-Nukleinsäuremoleküls

Verfahren zur Suppression eines bestimmten Proteins durch Verhinderung der Akkumulation seiner mRNA durch die  
25 "antisense"-Technologie sind vielfach - auch in Pflanzen - beschrieben (Sheehy et al. (1988) Proc Natl Acad Sci USA 85: 8805-8809; US 4,801,340; Mol JN et al. (1990) FEBS Lett 268(2):427-430). Das antisense Nukleinsäuremolekül hybridisiert bzw. bindet mit der zellulären mRNA und/oder genomischen DNA kodierend für das zu supprimierende BI-1-Zielprotein. Dadurch wird die Transkription und/oder Translation des Zielproteins unterdrückt. Die Hybridisierung kann auf  
30 konventionelle Art über die Bildung einer stabilen Duplex oder - im Fall von genomischer DNA - durch Bindung des antisense Nukleinsäuremoleküls mit der Duplex der genomischen DNA durch spezifische Wechselwirkung in der großen Furche der DNA-Helix entstehen. Das Einbringen erfolgt so, dass die BI-1-Menge oder Funktion spezifisch in der Epidermis reduziert wird, z.B. durch transiente Transformation der  
35 Epidermis oder stabile Transformation unter Kontrolle der Expression eines entsprechenden Konstruktes mit einem Epidermis-spezifischen Promoters.  
40

Eine antisense Nukleinsäuresequenz geeignet zur Verminderung eines BI-1-Proteins kann unter Verwendung der für dieses Protein kodierenden Nukleinsäuresequenz, beispielsweise der Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33 oder 38 oder kodierend für ein funktionelles Äquivalent derselben nach den Basenpaarregeln von Watson und Crick abgeleitet werden. Die antisense Nukleinsäuresequenz kann zu der gesamten transkribierten mRNA des besagten Proteins komplementär sein, sich auf die kodierende Region beschränken oder nur aus einem Oligonukleotid bestehen, das zu einem Teil der kodierenden oder nicht-kodierenden Sequenz der mRNA komplementär ist. So kann das Oligonukleotid beispielsweise komplementär zu der Region sein, die den Translationsstart für das besagte Protein umfasst. Antisense-Nukleinsäuresequenzen können eine Länge von zum Beispiel 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 oder 50 Nukleotide haben, können aber auch länger sein und mindestens 100, 200, 500, 1000, 2000 oder 5000 Nukleotide umfassen. Antisense-Nukleinsäuresequenzen können rekombinant exprimiert oder chemisch bzw. enzymatisch unter Verwendung von dem Fachmann bekannten Verfahren synthetisiert werden. Bei der chemischen Synthese können natürlich oder modifizierte Nukleotide verwendet werden. Modifizierte Nukleotide können der antisense Nukleinsäuresequenz eine erhöhte biochemische Stabilität verleihen und zu einer erhöhten physikalischen Stabilität der Duplex gebildet aus antisense-Nukleinsäuresequenz und sense-Zielsequenz führen. Verwendet werden können beispielsweise Phosphorothioatderivative und Acridin-substituierte Nukleotide wie 5-Fluorouracil, 5-Bromouracil, 5-Chlorouracil, 5-Iodouracil, Hypoxanthin, Xanthin, 4-Acetylcytosin, 5-(Carboxyhydroxymethyl)uracil, 5-Carboxymethylaminomethyl-2-thiouridin, 5-Carboxymethylaminomethyluracil, Dihydrouracil,  $\beta$ -D-Galactosylqueosin, Inosine, N6-Isopentenyladenin, 1-Methylguanin, 1-Methylinosin, 2,2-Dimethylguanin, 2-Methyladenin, 2-Methylguanin, 3-Methylcytosin, 5-Methylcytosin, N6-Adenin, 7-Methylguanin, 5-Methylaminomethyluracil, 5-Methoxyaminomethyl-2-thiouracil,  $\beta$ -D-mannosylqueosin, 5'-Methoxycarboxymethyluracil, 5-Methoxyuracil, 2-Methylthio-N6-isopentenyladenin, Uracil-5-oxyessigsäure, Pseudouracil, Queosine, 2-Thiocytosin, 5-Methyl-2-thiouracil, 2-Thiouracil, 4-Thiouracil, 5-Methyluracil, Uracil-5-oxyessigsäuremethylester, Uracil-5-oxyessigsäure, 5-Meth-

yl-2-thiouracil, 3-(3-Amino-3-N-2-carboxypropyl)uracil und 2,6-Diaminopurin.

5 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform kann die Expression eines BI-1-Proteins durch Nukleotidsequenzen inhibiert werden, die komplementär zu der regulatorischen Region eines BI-1-Gens (z.B. einem BI-1 Promoter und/oder Enhancer) sind und triple-helikale Strukturen mit der dortigen DNA-Doppelhelix ausbilden, so dass die Transkription  
10 des BI-1-Gens vermindert wird. Entsprechende Verfahren sind beschrieben (Helene C (1991) Anticancer Drug Res 6(6):569-84; Helene C et al. (1992) Ann NY Acad Sci 660:27-36; Maher LJ (1992) Bioassays 14(12):807-815).

15 In einer weiteren Ausführungsform kann das antisense Nukleinsäuremolekül eine  $\alpha$ -anomere Nukleinsäure sein. Derartige  $\alpha$ -anomere Nukleinsäuremoleküle bilden spezifische doppelsträngige Hybride mit komplementärer RNA in denen - im Unterschied zu den konventionellen  $\beta$ -Nukleinsäuren - die beiden Stränge parallel zueinander verlaufen (Gautier C  
20 et al. (1987) Nucleic Acids Res 15:6625-6641). Das antisense Nukleinsäuremolekül kann ferner auch 2'-O-Methylribonukleotide (Inoue et al. (1987) Nucleic Acids Res 15:6131-6148) oder chimäre RNA-DNA Analoge beinhalten (Inoue et al. (1987) FEBS Lett 215:327-330).

25 c) Einbringung eines BI-1 antisense-Nukleinsäuremoleküls kombiniert mit einem Ribozym

Vorteilhaft kann die oben beschriebene antisense-Strategie  
30 mit einem Ribozym-Verfahren gekoppelt werden. Katalytische RNA-Moleküle oder Ribozyme können an jede beliebige Ziel-RNA angepasst werden und spalten das Phosphodiester-Gerüst an spezifischen Positionen, wodurch die Ziel-RNA funktionell deaktiviert wird (Tanner NK (1999) FEMS Microbiol Rev  
35 23(3):257-275). Das Ribozym wird dadurch nicht selber modifiziert, sondern ist in der Lage, weitere Ziel-RNA-Moleküle analog zu spalten, wodurch es die Eigenschaften eines Enzyms erhält. Der Einbau von Ribozymsequenzen in "antisense"-RNAs verleiht eben diesen "antisense"-RNAs diese enzymähnliche,  
40 RNA-spaltende Eigenschaft und steigert so deren Effizienz bei der Inaktivierung der Ziel-RNA. Die Herstellung und Verwendung entsprechender Ribozym-"antisense"-RNA-Moleküle ist beispielsweise beschrieben bei Haseloff et al. (1988) Nature 334: 585-591.



Auf diese Art können Ribozyme (z.B. "Hammerhead"-Ribozyme; Haselhoff und Gerlach (1988) Nature 334:585-591) verwendet werden, um die mRNA eines zu supprimierenden Enzyms - z.B. BI-1 - katalytisch zu spalten und die Translation zu verhindern. Die Ribozym-Technologie kann die Effizienz einer antisense-Strategie erhöhen. Verfahren zur Expression von Ribozymen zur Verminderung bestimmter Proteine sind beschrieben in (EP 0 291 533, EP 0 321 201, EP 0 360 257). In pflanzlichen Zellen ist eine Ribozym-Expression ebenfalls beschrieben (Steinecke P et al. (1992) EMBO J 11(4):1525-1530; de Feyter R et al. (1996) Mol Gen Genet. 250(3):329-338). Geeignete Zielsequenzen und Ribozyme können zum Beispiel wie bei "Steinecke P, Ribozymes, Methods in Cell Biology 50, Galbraith et al. eds, Academic Press, Inc. (1995), S. 449-460" beschrieben, durch Sekundärstrukturberechnungen von Ribozym- und Ziel-RNA sowie durch deren Interaktion bestimmt werden (Bayley CC et al. (1992) Plant Mol Biol. 18(2):353-361; Lloyd AM and Davis RW et al. (1994) Mol Gen Genet. 242(6):653-657). Beispielsweise können Derivate der Tetrahymena L-19 IVS RNA konstruiert werden, die komplementäre Bereiche zu der mRNA des zu supprimierenden BI-1 Proteins aufweisen (siehe auch US 4,987,071 und US 5,116,742). Alternativ können solche Ribozyme auch über einen Selektionsprozess aus einer Bibliothek diverser Ribozyme identifiziert werden (Bartel D und Szostak JW (1993) Science 261:1411-1418). Die Expression erfolgt z.B. unter Kontrolle eines Epidermis-spezifischen Promoters.

- 30 d) Einbringung eines BI-1 sense-Nukleinsäuremoleküls zur Induktion eines Kosuppression

Die Epidermis-spezifische Expression eines BI-1 Nukleinsäuremoleküls in sense-Orientierung kann zu einer Kosuppression des entsprechenden homologen, endogenen Gens in Epidermiszellen führen. Die Expression von sense-RNA mit Homologie zu einem endogenen Gen kann die Expression desselben vermindern oder ausschalten, ähnlich wie es für antisense Ansätze beschrieben wurde (Jorgensen et al. (1996) Plant Mol Biol 31(5):957-973; Goring et al. (1991) Proc Natl Acad Sci USA 88:1770-1774; Smith et al. (1990) Mol Gen Genet 224:447-481; Napoli et al. (1990) Plant Cell 2:279-289; Van der Krol et al. (1990) Plant Cell 2:291-99). Dabei kann das eingeführte Konstrukt das zu vermindernde, homologe Gen

ganz oder nur teilweise repräsentieren. Die Möglichkeit zur Translation ist nicht erforderlich. Die Anwendung dieser Technologie auf Pflanzen ist beispielsweise beschrieben bei Napoli et al. (1990) The Plant Cell 2: 279-289 und in US 5,034,323.

Bevorzugt wird die Kosuppression unter Verwendung einer Sequenz realisiert, die im wesentlichen identisch ist zu zumindest einem Teil der Nukleinsäuresequenz kodierend für ein BI-1-Protein oder ein funktionelles Äquivalent desselben, beispielsweise der Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33 oder 38 oder der Nukleinsäuresequenz kodierend für ein funktionelles Äquivalent derselben.

- e) Einbringung von Nukleinsäuremolekülen kodierend für ein dominant-negatives BI-1 Protein

Die Funktion oder Aktivität eines BI-1 Protein kann effektiv auch durch Epidermis-spezifische Expression einer dominant-negativen Variante dieses BI-1-Proteins in Epidermiszellen reduziert werden. Verfahren zur Verminderung der Funktion bzw. Aktivität eines Protein mittels Koexpression seiner dominant-negativen Form sind dem Fachmann bekannt (Lagna G und Hemmati-Brivanlou A (1998) Current Topics in Developmental Biology 36:75-98; Perlmutter RM und Alberola-Ila J (1996) Current Opinion in Immunology 8(2):285-90; Sheppard D (1994) American Journal of Respiratory Cell & Molecular Biology. 11(1):1-6; Herskowitz I (1987) Nature 329(6136):219-22).

Die bevorzugt zu mutierende Aminosäure in BI-1 Homologen aus anderen Arten kann beispielsweise mittels Computer-unterstütztem Vergleich ("Alignment") ermittelt werden. Diese Mutationen zum Erreichen einer dominant-negativen BI-1 Variante werden bevorzugt auf der Ebene der Nukleinsäuresequenz kodierend für BI-1 Proteine durchgeführt. Eine entsprechende Mutation kann beispielsweise durch PCR vermittelte in vitro Mutagenese unter Verwendung entsprechender Oligonukleotidprimer, durch welche die gewünschte Mutation eingeführt wird, realisiert werden. Dazu werden dem Fachmann geläufige Verfahren verwendet. Beispielsweise kann zu diesem Zweck der "LA PCR in vitro Mutagenesis Kit" (Takara Shuzo, Kyoto) verwendet werden. Ein Verfahren zur Herstellung einer

dominant-negativen Variante eines RacB-Proteins aus Mais ist auch in WO 00/15815 (Beispiel 4, S. 69) beschrieben.

5 Die Expression einer solchen Mutante kann dann z.B. unter Kontrolle eines Epidermis-spezifischen Promoters erfolgen.

f) Einbringung DNA-oder Protein-bindende Faktoren gegen BI-1 Gene, -RNAs oder Proteine

10 Eine Verminderung einer BI-1 Genexpression in der Epidermis ist auch mit spezifischen DNA-bindenden Faktoren z.B. mit Faktoren vom Typus der Zinkfingertranskriptionsfaktoren möglich. Diese Faktoren lagern sich an die genomische Sequenz des endogenen Zielgens, bevorzugt in den regulatorischen Bereichen, an und bewirken eine Repression des endogenen Gens. Die Verwendung eines solchen Verfahrens ermöglicht die Verminderung der Expression eines endogenen BI-1 Gens, ohne dass dessen Sequenz gentechnisch manipuliert werden muss. Entsprechende Verfahren zur Herstellung entsprechender Faktoren sind beschrieben (Dreier B et al. (2001) J Biol Chem 276(31):29466-78; Dreier B et al. (2000) J Mol Biol 303(4):489-502; Beerli RR et al. (2000) Proc Natl Acad Sci USA 97 (4):1495-1500; Beerli RR et al. (2000) J Biol Chem 275(42):32617-32627; Segal DJ and Barbas CF 3<sup>rd</sup> (2000) Curr Opin Chem Biol 4(1):34-39; Kang JS and Kim JS (2000) J Biol Chem 275(12):8742-8748; Beerli RR et al. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95(25):14628- 14633; Kim JS et al. (1997) Proc Natl Acad Sci USA 94(8):3616 -3620; Klug A (1999) J Mol Biol 293(2):215-218; Tsai SY et al. (1998) Adv Drug Deliv Rev 30(1-3):23-31; Mapp AK et al. (2000) Proc Natl Acad Sci USA 97(8):3930-3935; Sharrocks AD et al. (1997) Int J Biochem Cell Biol 29(12):1371-1387; Zhang L et al. (2000) J Biol Chem 275(43):33850-33860).

35 Die Selektion dieser Faktoren kann unter Verwendung eines beliebigen Stückes eines BI-1-Gens erfolgen. Bevorzugt liegt dieser Abschnitt im Bereich der Promotorregion. Für eine Genunterdrückung kann er aber auch im Bereich der kodierenden Exons oder Introns liegen. Die entsprechenden Abschnitte sind für den Fachmann mittels Datenbankabfrage aus der Genbank oder - ausgehend von einer BI-1 cDNA, deren Gen nicht in der Genbank vorhanden ist, durch Durchmusterung einer genomischen Bibliothek nach korrespondierenden genomischen Klonen erhältlich. Die dazu erforderlichen Verfahren sind

40

dem Fachmann geläufig, z.B. können diese Faktoren unter Kontrolle eines Epidermis-spezifischen Promoters oder anderer eine Epidermis-spezifische Expression vermittelnden Faktoren exprimiert werden.

5

Ferner können Faktoren in eine Zelle eingebracht werden, die das BI-1 Zielprotein selber inhibieren. Die proteinbindenden Faktoren können z.B. Aptamere (Famulok M und Mayer G (1999) Curr Top Microbiol Immunol 243:123-36) oder Antikörper bzw. Antikörperfragmente oder einzelkettige Antikörper sein. Die Gewinnung dieser Faktoren ist beschrieben und dem Fachmann bekannt. Beispielsweise wurde ein cytoplasmatischer scFv Antikörper eingesetzt, um die Aktivität des Phytochrom A Proteins in gentechnisch veränderten Tabakpflanzen zu modulieren (Owen M et al. (1992) Biotechnology (N Y) 10(7):790-794; Franken E et al. (1997) Curr Opin Biotechnol 8(4):411-416; Whitelam (1996) Trend Plant Sci 1:286-272).

10

15

20

25

30

35

Die Genexpression kann auch durch maßgeschneiderte, niedermolekulare synthetische Verbindungen unterdrückt werden, beispielsweise vom Polyamid-Typ (Dervan PB und Bürli RW (1999) Current Opinion in Chemical Biology 3:688-693; Gottesfeld JM et al. (2000) Gene Expr 9(1-2):77-91). Diese Oligomere bestehen aus den Bausteinen 3-(Dimethylamino)-propylamin, N-Methyl-3-hydroxypyrrol, N-Methylimidazol und N-Methylpyrrole und können an jedes Stück doppelsträngiger DNA so angepasst werden, dass sie sequenzspezifisch in die große Furche binden und die Expression der dortigen Gensequenzen blockieren. Entsprechende Verfahren sind beschrieben (siehe unter anderem Bremer RE et al. (2001) Bioorg Med Chem. 9(8):2093-103; Ansari AZ et al. (2001) Chem Biol. 8(6):583-92; Gottesfeld JM et al. (2001) J Mol Biol. 309(3):615-29; Wurtz NR et al. (2001) Org Lett 3(8):1201-3; Wang CC et al. (2001) Bioorg Med Chem 9(3):653-7; Urbach AR und Dervan PB (2001) Proc Natl Acad Sci USA 98(8):4343-8; Chiang SY et al. (2000) J Biol Chem. 275(32):24246-54).

40

Alle genannten Faktoren werden Epidermis-spezifisch eingebracht, um eine Reduktion der BI-1-Aktivität lediglich in Epidermiszellen zu gewährleisten, z.B. durch Expression unter Kontrolle eines Epidermis-spezifischen Promoters, wie sie z.B. oben genannt sind.

- g) Einbringung von den BI-1 RNA-Abbau bewirkenden viralen Nukleinsäuremolekülen und entsprechenden Expressionskonstrukten

5 Die BI-1 Expression in der Epidermis kann effektiv auch durch Induktion des spezifischen BI-1 RNA-Abbaus in Epidermiszellen mit Hilfe eines viralen Expressionssystems (Amplikon) (Angell, SM et al. (1999) Plant J. 20(3):357-362) realisiert werden. Diese Systeme - auch als "VIGS" (viral induced gene silencing) bezeichnet - bringen Nukleinsäuremoleküle mit Homologie zu den zu supprimierenden Transkripten mittels viraler Vektoren in die Pflanze ein. Die Transkription wird sodann - vermutlich mediert durch pflanzliche Abwehrmechanismen gegen Viren - abgeschaltet. Entsprechende Techniken und Verfahren sind beschrieben (Ratcliff F et al. 10 (2001) Plant J 25(2):237-45; Fagard M und Vaucheret H (2000) Plant Mol Biol 43(2-3):285-93; Anandalakshmi R et al. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95(22):13079-84; Ruiz MT (1998) Plant Cell 10(6): 937-46).

20

- h) Einbringung von Konstrukten zur Induktion einer homologen Rekombination an endogenen BI-1-Genen beispielsweise zur Erzeugung von Knockout-Mutanten

25 Zur Herstellung eines homolog rekombinanten Organismus mit verminderter BI-1-Aktivität in den Epidermiszellen verwendet man beispielsweise ein Nukleinsäurekonstrukt, das zumindest einen Teil eines endogenen BI-1 Gens enthält, das durch eine Deletion, Addition oder Substitution mindestens eines 30 Nukleotids so verändert wird, so dass die Funktionalität vermindert oder gänzlich aufgehoben wird. Die Veränderung kann auch die regulativen Elemente (z.B. den Promotor) des Gens betreffen, so dass die kodierende Sequenz unverändert bleibt, eine Expression (Transkription und/oder Translation) 35 jedoch unterbleibt und vermindert wird.

40

Bei der konventionellen homologen Rekombination ist die veränderte Region an ihrem 5'- und 3'-Ende von weiteren Nukleinsäuresequenzen flankiert, die eine ausreichende Länge für die Ermöglichung der Rekombination aufweisen müssen. Die Länge liegt in der Regel in einem Bereich von mehreren einhundert Basen bis zu mehreren Kilobasen (Thomas KR und Capecechi MR (1987) Cell 51:503; Strepp et al. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95(8):4368-4373). Für die homologe

Rekombination wird der Wirtsorganismus - zum Beispiel eine Pflanze - mit dem Rekombinationskonstrukt unter Verwendung der unten beschriebenen Verfahren transformiert und erfolgreich rekombinierte Klone unter Verwendung zum Beispiel einer Antibiotika- oder Herbizidresistenz selektioniert.

Homologe Rekombination ist ein relativ seltenes Ereignis in höheren Eukaryoten, vor allem in Pflanzen. Zufällige Integrationen in das Wirtsgenom überwiegen. Eine Möglichkeit die zufällig integrierten Sequenzen zu entfernen und so Zellklone mit einer korrekten homologen Rekombination anzureichern, besteht in der Verwendung eines sequenzspezifischen Rekombinationssystems wie in US 6,110,736 beschrieben, durch welche unspezifisch integrierte Sequenzen wieder deletiert werden können, was die Selektion erfolgreich über homologe Rekombination integrierter Ereignisse erleichtert. Eine Vielzahl von sequenzspezifischen Rekombinationssystemen kann verwendet werden, beispielhaft sind das Cre/lox-System des Bacteriophagen P1, das FLP/FRT System der Hefe, die Gin Rekombinase des Mu Phagen, die Pin Rekombinase aus E. coli und das R/RS System des pSR1 Plasmids genannt. Bevorzugt sind das Bacteriophagen P1 Cre/lox und das Hefe FLP/FRT System. Das FLP/FRT und cre/lox Rekombinasesystem wurde bereits in pflanzlichen Systemen angewendet (Odell et al. (1990) Mol Gen Genet 223: 369-378). Die Epidermis-spezifische Rekombination kann z.B. dadurch gewährleistet werden, dass die Expression der die Rekombination vermittelnden Systeme und Enzyme unter Kontrolle eines Epidermis-spezifischen Promoters erfolgt.

- i) Einführung von Mutationen in endogene BI-1 Gene zur Erzeugung eines Funktionsverlustes (z.B. Generierung von Stopp-Kodons, Verschiebungen im Leseraster etc.)

Weitere geeignete Methoden zur Verminderung der BI-1-Aktivität sind die Einführung von Nonsense-Mutationen in endogene BI-1 Gene zum Beispiel mittels Einführung von RNA/DNA-Oligonukleotiden in die Epidermiszellen (Zhu et al. (2000) Nat Biotechnol 18(5):555-558) sowie die Generierung von Knock-out-Mutanten mit Hilfe von z.B. T-DNA-Mutagenese (Koncz et al. (1992) Plant Mol Biol 20(5):963-976), ENU-(N-Ethyl-N-nitrosoharnstoff) - Mutagenese oder homologer Rekombination (Hohn B und Puchta (1999) H Proc Natl Acad Sci USA 96:8321-8323.). Punktmutationen können auch mittels DNA-RNA Hybriden

erzeugt werden, die auch als "chimeraplasty" bekannt sind (Cole-Strauss et al. (1999) Nucl Acids Res 27(5):1323-1330; Kmiec (1999) Gene therapy American Scientist 87(3):240-247).

- 5 Die Methoden der dsRNAi, der Kosuppression mittels sense-RNA und der "VIGS" ("virus induced gene silencing") werden auch als "post-transcriptional gene silencing" (PTGS) bezeichnet. PTGS-Verfahren wie auch die Verminderung der BI-1-Funktion oder Aktivität mit dominant-negativen BI-1-Varianten sind besonders  
10 vorteilhaft, weil die Anforderungen an die Homologie zwischen dem zu supprimierenden endogenem Gen und der transgen exprimierten sense- oder dsRNA-Nukleinsäuresequenz (bzw. zwischen dem endogenen Gen und seiner dominant-negativen Variante) geringer sind als beispielsweise bei einem klassischen antisense-Ansatz.  
15 Entsprechende Homologie-Kriterien sind bei der Beschreibung des dsRNAi-Verfahrens genannt und allgemein für PTGS-Verfahren oder dominant-negative Ansätze übertragbar. So kann man voraussichtlich unter Verwendung der BI-1-Nukleinsäuresequenzen auch die Expression von homologen BI-1-Proteinen in anderen Arten  
20 effektiv supprimieren, ohne dass die Isolierung und Struktur- aufklärung der dort vorkommenden BI-1-Homologen zwingend erforderlich wäre. Dies erleichtert erheblich den Arbeits- aufwand. Analog kann man voraussichtlich auch unter Verwendung von dominant-negativen Varianten eines BI-1-Proteins die  
25 Funktion/Aktivität seines Homologs in anderen Pflanzenarten effektiv vermindern oder unterdrücken.

- Alle Substanzen und Verbindungen die direkt oder indirekt eine Verminderung der Proteinmenge, RNA-Menge, Genaktivität oder  
30 Proteinaktivität eines BI-1-Proteins bewirken, seien infolge unter der Bezeichnung "anti-BI-1"-Verbindungen zusammengefasst. Der Begriff "anti-BI-1"-Verbindung schließt explizit die in den oben beschriebenen Verfahren zum Einsatz kommenden Nukleinsäuresequenzen, Peptide, Proteine oder andere Faktoren ein.

- 35 "Einbringung" umfasst im Rahmen der Erfindung alle Verfahren, die dazu geeignet eine "anti-BI-1"-Verbindung, direkt oder indirekt, in der Epidermis oder einem wesentlichen Teil der Epidermiszellen, Kompartiment oder Gewebe derselben einzuführen  
40 oder dort zu generieren. Direkte und indirekte Verfahren sind umfasst. Die Einbringung kann zu einer vorübergehenden (transienten) Präsenz einer "anti-BI-1"-Verbindung (beispielsweise einer dsRNA) führen oder aber auch zu einer dauerhaften (stabilen).

Gemäß der unterschiedlichen Natur der oben beschriebenen Ansätze kann die "anti-BI-1"-Verbindung ihre Funktion direkt ausüben (zum Beispiel durch Insertion in ein endogenes BI-1 Gen). Die Funktion kann aber auch indirekt nach Transkription in eine RNA (zum Beispiel bei antisense Ansätzen) oder nach Transkription und Translation in ein Protein (zum Beispiel bei Bindungsfaktoren) ausgeübt werden. Sowohl direkte als auch indirekt wirkende "anti-BI-1"-Verbindungen sind erfindungsgemäß umfasst.

10

Einführen umfasst beispielsweise Verfahren wie Transfektion, Transduktion oder Transformation.

"Anti-BI-1" Verbindungen umfasst somit beispielsweise auch rekombinante Expressionskonstrukte, die eine Expression (d.h. Transkription und ggf. Translation) beispielsweise einer BI-1-dsRNA oder einer BI-1 "antisense"-RNA Epidermis-spezifisch bedingen.

In besagten Expressionskonstrukten steht ein Nukleinsäuremolekül, dessen Expression (Transkription und ggf. Translation) eine "anti-BI-1"-Verbindung generiert, bevorzugt in funktioneller Verknüpfung mit mindestens einem genetischen Kontrollelement (beispielsweise einem Promotor), das eine Expression in einem Organismus, bevorzugt in Pflanzen, gewährleistet, vorzugsweise Epidermis-spezifisch. Soll das Expressionskonstrukt direkt in die Pflanze eingeführt und die "anti-BI-1"-Verbindung (beispielsweise die BI-1 dsRNA) dort in planta erzeugt werden, so sind pflanzenspezifische genetische Kontrollelemente (beispielsweise Promotoren) bevorzugt, wobei aus dem oben gesagten die Epidermis-spezifische Aktivität des Promoters für eine Epidermis-spezifische Reduktion von BI-1 in den meisten Ausführungsformen wie oben beschrieben zwingend ist. Die "anti-BI-1"-Verbindung kann jedoch auch in anderen Organismen oder in vitro erzeugt und dann in die Pflanze eingebracht werden. In diesem sind all prokaryotischen oder eukaryotischen genetischen Kontrollelemente (beispielsweise Promotoren) bevorzugt, die die Expression in den jeweils für die Herstellung gewählten Organismus erlauben.

40

Unter einer funktionellen Verknüpfung versteht man zum Beispiel die sequentielle Anordnung eines Promotors mit der zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz (zum Beispiel einer "anti-BI-1"-Verbindung) und ggf. weiterer regulativer Elemente wie zum



Beispiel einem Terminator derart, dass jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der transgenen Expression der Nukleinsäuresequenz, je nach Anordnung der Nukleinsäuresequenzen zu sense oder anti-sense RNA, erfüllen kann. Dazu ist nicht  
5 unbedingt eine direkte Verknüpfung im chemischen Sinne erforderlich. Genetische Kontrollsequenzen, wie zum Beispiel Enhancer-Sequenzen, können ihre Funktion auch von weiter entfernten Positionen oder gar von anderen DNA-Molekülen aus auf die Zielsequenz ausüben (cis- bzw. trans-Lokalisation). Bevorzugt  
10 sind Anordnungen, in denen die transgen zu exprimierende Nukleinsäuresequenz hinter der als Promoter fungierenden Sequenz positioniert wird, so dass beide Sequenzen kovalent miteinander verbunden sind. Bevorzugt ist dabei der Abstand zwischen der Promotorsequenz und der transgen zu exprimierende Nuklein-  
15 säuresequenz geringer als 200 Basenpaare, besonders bevorzugt kleiner als 100 Basenpaare, ganz besonders bevorzugt kleiner als 50 Basenpaare.

Die Herstellung einer funktionellen Verknüpfung als auch die  
20 Herstellung einer Expressionskassette kann mittels gängiger Rekombinations- und Klonierungstechniken realisiert werden, wie sie beispielsweise in Maniatis T, Fritsch EF und Sambrook J (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (NY), in Silhavy TJ, Berman ML und Enquist LW (1984) Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (NY), in  
25 Ausubel FM et al. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience und bei Gelvin et al. (1990) In: Plant Molecular Biology Manual beschrieben sind. Zwischen beide Sequenzen können aber auch weitere  
30 Sequenzen positioniert werden, die zum Beispiel die Funktion eines Linkers mit bestimmten Restriktionsenzymchnittstellen oder eines Signalpeptides haben. Auch kann die Insertion von Sequenzen zur Expression von Fusionsproteinen führen. Bevorzugt  
35 kann die Expressionskassette, bestehend aus einer Verknüpfung von Promoter und zu exprimierender Nukleinsäuresequenz, integriert in einem Vektor vorliegen und durch zum Beispiel Transformation in ein pflanzliches Genom insertiert werden. Die Kontrollelemente vermitteln bevorzugt eine Epidermis-spezifische  
40 Expression.

Die obengenannten Verfahren (a) bis (i) können auch für die Reduktion der Aktivität oder Funktion, insbesondere der Expression der anderen hier genannten Proteine eingesetzt

werden, insbesondere zur Reduktion von MLO, RacB und NaOx verwendet werden.

Das BII-Protein aus Gerste (hvBII) wird vorwiegend im Mesophyll  
5 exprimiert (Beispiel 6) und infolge einer Infektion mit *Blumeria*  
(syn. *Erysiphe*) *graminis* f. *sp.hordei* hochreguliert (Beispiel  
2). Die rekombinante mesophyll-spezifische Überexpression in  
mlo-resistenter Gerste führt - neben der Resistenz gegen  
insbesondere nekrotrophe und hemibiotrophe Pathogene - zu einer  
10 *Blumeria* (syn. *Erysiphe*) *graminis* f. *sp.hordei* -resistenten  
Pflanze, die keine nekrotischen Flecken („mlo-Flecken“; negative  
Begleiterscheinung der mlo-Resistenz) zeigt. Unter Ausnutzen  
dieses Effekts lassen sich die negativen Begleiterscheinungen  
der mlo-vermittelten Resistenz (Ertragseinbuße von ca. 5%,  
15 Jörgensen JH (1992) *Euphytica* 63: 141-152); Hypersuszeptibilität  
gegen nekrotrophe Pilze, Jarosch B et al. (1999) *Mol Plant*  
*Microbe Interact* 12:508-514; Kumar J et al. (2001)  
*Phytopathology* 91:127-133) unterdrücken, ohne dass die mlo-  
Resistenz selber beeinträchtigt wird.

20 Ferner kann überraschenderweise gezeigt werden, dass eine  
Überexpression von BII eine Resistenz gegen Streßfaktoren wie  
nekrosen-auslösende Agenzien (isoliert z.B. aus nekrotrophen  
Schadpilzen; Beispiel 2) zur Folge hat.

25 Das erfindungsgemäße Verfahren bietet demnach eine effiziente  
biotechnologische Strategie der Resistenz gegen Nekrotisierung  
durch endogenen, abiotischen und biotischen Streß -  
beispielsweise mlo-Flecken, Ozonschäden, nekrotrophe und  
30 hemibiotrophe Schadorganismen.

BII-Proteine scheinen zentrale Regulatoren der rasse-  
unspezifischen Pilzresistenz in Pflanzen zu sein. Dies  
ermöglicht eine breite Einsetzbarkeit in biotechnologischen  
35 Strategien zur Erhöhung der Pathogenresistenz in Pflanzen  
insbesondere der Pilzresistenz. Das erfindungsgemäße Verfahren  
kann im Prinzip auf alle Pflanzenarten angewendet werden. BII-  
Proteine wurden in zahlreichen Pflanzen - Monokotyledonen und  
Dikotyledonen - identifiziert (s.o.).

40 "Ungefähr" meint im Rahmen dieser Erfindung im Zusammenhang mit  
Zahlen- oder Größenangaben einen Zahlen- oder Größenbereich um  
den angegebenen Zahlen- oder Größenwert herum. Im allgemeinen

meint der Begriff ungefähr einen Bereich von jeweils 20% des angegebenen Wertes nach oben und nach unten.

- 5 "Pflanze" im Rahmen der Erfindung meint alle Gattungen und Arten höherer und niedrigerer Pflanzen des Pflanzenreiches. Eingeschlossen unter dem Begriff sind die reifen Pflanzen, Saatgut, Sprossen und Keimlinge, sowie davon abgeleitete Teile, Vermehrungsgut, Pflanzenorgane, Gewebe, Protoplasten, Kallus und andere Kulturen, zum Beispiel Zellkulturen, sowie alle anderen
- 10 Arten von Gruppierungen von Pflanzenzellen zu funktionellen oder strukturellen Einheiten. Reife Pflanzen meint Pflanzen zu jedem beliebigen Entwicklungsstadium jenseits des Keimlings. Keimling meint eine junge, unreife Pflanze in einem frühen Entwicklungsstadium.
- 15 "Pflanze" umfaßt alle einjährigen und mehrjährige, monokotyledonen und dikotyledonen Pflanzen und schließt beispielhaft jedoch nicht einschränkend solche der Gattungen Cucurbita, Rosa, Vitis, Juglans, Fragaria, Lotus, Medicago,
- 20 Onobrychis, Trifolium, Trigonella, Vigna, Citrus, Linum, Geranium, Manihot, Daucus, Arabidopsis, Brassica, Raphanus, Sinapis, Atropa, Capsicum, Datura, Hyoscyamus, Lycopersicon, Nicotiana, Solarium, Petunia, Digitalis, Majorana, Cichorium, Helianthus, Lactuca, Bromus, Asparagus, Antirrhinum,
- 25 Heterocallis, Nemesis, Pelargonium, Panieum, Pennisetum, Ranunculus, Senecio, Salpiglossis, Cucumis, Browaalia, Glycine, Pisum, Phaseolus, Lolium, Oryza, Zea, Avena, Hordeum, Secale, Triticum, Sorghum, Picea und Populus ein.
- 30 Der Begriff "Pflanze" umfaßt bevorzugt monokotyledone Kulturpflanzen, wie zum Beispiel Getreidearten wie Weizen, Gerste, Hirse, Roggen, Triticale, Mais, Reis, Sorghum oder Hafer sowie Zuckerrohr.
- 35 Ferner umfaßt der Begriff dikotyledonen Kulturpflanzen, wie zum Beispiel
- Brassicaceae wie Raps, Rübsen, Kresse, Arabidopsis, Kohllarten,
- 40
- Leguminosae wie Soja, Alfalfa, Erbse, Bohnengewächsen oder Erdnuss

- Solanaceae wie Kartoffel, Tabak, Tomate, Aubergine oder Paprika,
- Asteraceae wie Sonnenblume, Tagetes, Salat oder Calendula,
- 5 - Cucurbitaceae wie Melone, Kürbis oder Zucchini,

sowie Lein (Flachs), Baumwolle, Hanf, Klee, Spinat, Roter Pfeffer, Möhre, Karotte, Rübe, Rettich, Zuckerrübe, Süßkartoffel, Gurke, Chicorée, Blumenkohl, Brokkoli, Spargel, Zwiebel, Knoblauch, Sellerie, Erdbeere, Himbeere, Brombeere, Ananas, Avocado, und den verschiedenen Baum-, Strauch-, Nuß- und Weinarten. Baumarten umfaßt bevorzugt Pflaume, Kirsche, Pfirsich, Nektarine, Aprikose, Banane, Papaya, Mango, Apfel, Birne, Quitte.

Im Rahmen der Erfindung sind solche Pflanzen bevorzugt, die als Nahrungs- oder Futtermittel zum Einsatz kommen, ganz besonders bevorzugt monokotyledone Gattungen und Arten mit landwirtschaftlicher Bedeutung wie Weizen, Hafer, Hirse, Gerste, Roggen, Mais, Reis, Buchweizen, Sorghum, Triticale, Dinkel, Leinsamen oder Zuckerrohr.

Der Begriff "Streßfaktor" umfaßt im Rahmen der vorliegenden Erfindung biotische Streßfaktoren (wie insbesondere die unten aufgeführten Pathogene) sowie abiotische Streßfaktoren. Beispielfhaft jedoch nicht einschränkend sind als abiotische Streßfaktoren zu nennen: Chemischer Streß (z.B. durch Agrar- und/oder Umweltchemikalien), US-Bestrahlung, Hitze, Kälte, Wassermangel, erhöhte Feuchtigkeit.

"Streßresistenz" meint das Vermindern oder Abschwächen von Symptomen einer Pflanze infolge von Stress. Die Symptome können vielfältiger Art sein, umfassen aber bevorzugt solche die direkt oder indirekt zu einer Beeinträchtigung Qualität der Pflanze, der Quantität des Ertrages, der Eignung zur Verwendung als Futter- oder Nahrungsmittel führen oder aber auch Aussaat, Anbau, Ernte oder Prozessierung des Erntegutes erschweren.

"Pathogenresistenz" meint das Vermindern oder Abschwächen von Krankheitssymptomen einer Pflanze infolge eines Befalls durch mindestens ein Pathogen. Die Symptome können vielfältiger Art sein, umfassen aber bevorzugt solche die direkt oder indirekt zu einer Beeinträchtigung Qualität der Pflanze, der Quantität des

Ertrages, der Eignung zur Verwendung als Futter- oder Nahrungsmittel führen oder aber auch Aussaat, Anbau, Ernte oder Prozessierung des Erntegutes erschweren.

- 5 "Verleihen", "bestehen", "erzeugen" oder "erhöhen" einer Stress- oder Pathogenresistenz meint, dass die Abwehrmechanismen einer bestimmten Pflanzenart oder -sorte durch Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens im Vergleich zu dem Wildtyp der Pflanze ("Ausgangspflanze"), auf den das erfindungsgemäße
- 10 Verfahren nicht angewendet wurde, unter ansonsten gleichen Bedingungen (wie beispielsweise Klima- oder Anbaubedingungen, Stress- oder Pathogenart etc.) eine erhöhte Resistenz gegen ein und mehrere Stressfaktoren bzw. Pathogene aufweist. Dabei äußert sich die erhöhte Resistenz bevorzugt in einer verminderten
- 15 Ausprägung der Stress- oder Krankheitssymptome, wobei Krankheitssymptome - neben den oben erwähnten Beeinträchtigungen - auch beispielsweise die Penetrationseffizienz eines Pathogens in die Pflanze oder pflanzliche Zellen oder die Proliferationseffizienz in oder auf denselben umfaßt. Dabei sind
- 20 die Stress- oder Krankheitssymptome bevorzugt um mindestens 10 % oder mindestens 20 %, besonders bevorzugt um mindestens 40 % oder 60 %, ganz besonders bevorzugt um mindestens 70 % oder 80 %, am meisten bevorzugt um mindestens 90 % oder 95 % vermindert.
- 25 "Auswahl" meint in Bezug auf Pflanzen, bei denen - im Unterschied oder Vergleich zur Ausgangspflanze - die Resistenz gegen mindestens einen Stressfaktor oder Pathogen besteht oder erhöht ist, all die Verfahren, die eine zur Erkennung einer vorliegenden oder erhöhten Stress- bzw. Pathogenresistenz
- 30 geeignet sind. Dies können beispielsweise Symptome der Pathogeninfektion sein (z.B. Nekrosen-Ausbildung bei Pilzinfektion) aber auch die oben beschriebenen Symptome umfassen, die die Qualität der Pflanze, die Quantität des Ertrages, die Eignung zur Verwendung als Futter- oder
- 35 Nahrungsmittel usw. betreffen.

- "Pathogen" meint im Rahmen der Erfindung beispielsweise jedoch nicht einschränkend Viren oder Viroide, Bakterien, Pilze, tierische Schädlinge, wie beispielsweise Insekten oder
- 40 Nematoden. Besonders bevorzugt sind Pilze, insbesondere nekrotrophe oder hemibiotrophe Pilze. Es ist jedoch anzunehmen, dass die mesophyll-spezifische Expression eines BII-Proteins auch eine Resistenz gegen weitere Pathogene bewirkt, da insgesamt eine Resistenz gegen Streßfaktoren erzeugt wird.

Beispielsweise jedoch nicht einschränkend seien nachfolgende Pathogene zu nennen:

5 1. Pilzpathogene oder pilz-ähnliche Pathogene:

Pilzpathogene oder pilz-ähnliche Pathogene (wie z.B. Chromista) stammen vorzugsweise aus der Gruppe umfassend Plasmodiophoromycota, Oomycota, Ascomycota, Chytridiomyceten, Zygomyceten, Basidiomycota und Deuteromyceten (Fungi imperfecti). Beispielsweise jedoch nicht einschränkend seien die in Tabelle 1 bis 4 genannten Pathogene und die mit ihnen in Zusammenhang gebrachten Erkrankungen zu nennen. Folgende englische und deutsche Termini können alternativ verwendet werden:

Ährenfäule - ear rot / head blight  
 Stengelfäule - stalk rot  
 Wurzelfäule - root rot  
 20 Rost - rust  
 Falscher Mehltau downy mildew

Weiter Übersetzungen können beispielsweise bei <http://www.bba.de/english/database/psmengl/pilz.htm> gefunden werden.

Tabelle 1: Erkrankungen hervorgerufen durch biotrophe, phytopathogene Pilze

Erkrankung	Pathogen
Braunrost	<i>Puccinia recondita</i>
Gelbrost	<i>P. striiformis</i>
Echter Mehltau	<i>Erysiphe graminis</i> / <i>Blumeria graminis</i>
Rost (gemeiner Mais)	<i>Puccinia sorghi</i>
Rost (südlicher Mais)	<i>Puccinia polysora</i>
Tabak Blattflecken	<i>Cercospora nicotianae</i>
Rost (tropischer Mais)	<i>Physopella pallescens</i> , <i>P. zeae</i> = <i>Angiopsora zeae</i>

Tabelle 2: Erkrankungen hervorgerufen durch nekrotrophe und/oder hemibiotrophe Pilze und Oomyceten

Erkrankung	Pathogen
Spelzenbräune	Septoria (Stagonospora) nodorum
Blattdürre	Septoria tritici
Ährenfusariosen	Fusarium spp.
Halmbruchkrankheit	Pseudocercospora herpotrichoides
Flugbrand	Ustilago spp.
Kraut- und Knollenfäule	Phytophthora infestans
Weizensteinbrand	Tilletia caries
Schwarzbeinigkeit	Gaeumannomyces graminis
Anthracnose leaf blight Anthracnose stalk rot	Colletotrichum graminicola (teleomorph: Glomerella graminicola Politis); Glomerella tucumanensis (anamorph: Glomerella falcatum Went)
Aspergillus ear and kernel rot	Aspergillus flavus
Banded leaf and sheath spot ("Wurzeltöter")	Rhizoctonia solani Kuhn = Rhizoctonia microsclerotia J. Matz (telomorph: Thanatephorus cucumeris)
Black bundle disease	Acremonium strictum W. Gams = Cephalosporium acremonium Auct. non Corda
Black kernel rot	Lasioidiplodia theobromae = Botryodiplodia theobromae
Borde blanco	Marasmiellus sp.
Brown spot (black spot, stalk rot)	Physoderma maydis
Cephalosporium kernel rot	Acremonium strictum = Cephalosporium acremonium
Charcoal rot	Macrophomina phaseolina
Corticium ear rot	Thanatephorus cucumeris = Corticium sasakii
Curvularia leaf spot	Curvularia clavata, C. eragrostidis, = C. maculans (teleomorph: Cochliobolus eragrostidis), Curvularia inaequalis, C. intermedia (teleomorph: Cochliobolus intermedius), Curvularia lunata (teleomorph: Cochliobolus lunatus), Curvularia pallescens (teleomorph:

Erkrankung	Pathogen
	<i>Cochliobolus pallescens</i> ), <i>Curvularia senegalensis</i> , <i>C.</i> <i>tuberculata</i> (teleomorph: <i>Cochliobolus tuberculatus</i> )
Didymella leaf spot	<i>Didymella exitalis</i>
Diplodia Ähren- und Stengelfäule	<i>Diplodia frumenti</i> (teleomorph: <i>Botryosphaeria festucae</i> )
Diplodia Ähren- und Stengelfäule, seed rot and seedling blight	<i>Diplodia maydis</i> = <i>Stenocarpella maydis</i>
Diplodia leaf spot or streak	<i>Stenocarpella macrospora</i> = <i>Diplodia leaf macrospora</i>
Brown stripe downy mildew	<i>Sclerophthora rayssiae</i> var. <i>zeae</i>
Crazy top downy mildew	<i>Sclerophthora macrospora</i> = <i>Sclerospora macrospora</i>
Green ear downy mi ldew (graminicola downy mildew)	<i>Sclerospora graminicola</i>
Dry ear rot (cob, kernel and stalk rot)	<i>Nigrospora oryzae</i> (teleomorph: <i>Khuskia oryzae</i> )
Ährenfäulen (minor)	<i>Alternaria alternata</i> = <i>A. tenuis</i> , <i>Aspergillus glaucus</i> , <i>A. niger</i> , <i>Aspergillus</i> spp., <i>Botrytis cinerea</i> (teleomorph: <i>Botryotinia</i> <i>fuckeliana</i> ), <i>Cunninghamella</i> sp., <i>Curvularia pallescens</i> , <i>Doratomyces stemonitis</i> = <i>Cephalotrichum stemonitis</i> , <i>Fusarium culmorum</i> , <i>Gonatobotrys simplex</i> , <i>Pithomyces maydis</i> , <i>Rhizopus microsporus</i> Tiegh., <i>R. stolonifer</i> = <i>R. nigricans</i> , <i>Scopulariopsis brumptii</i>
Ergot (horse's tooth)	<i>Claviceps gigantea</i> (anamorph: <i>Sphacelia</i> sp.)
Eyespot	<i>Aureobasidium zeae</i> = <i>Kabatiella</i> <i>zeae</i>
Fusarium Ähren- und Stengelfäule	<i>Fusarium subglutinans</i> = <i>F. moniliforme</i> var. <i>subglutinans</i>
Fusarium kernel, root and stalk rot, seed rot and seedling blight	<i>Fusarium moniliforme</i> (teleomorph: <i>Gibberella fujikuroi</i> )
Fusarium Stengelfäule, seedling root rot	<i>Fusarium avenaceum</i> (teleomorph: <i>Gibberella avenacea</i> )



Erkrankung	Pathogen
Gibberella Ähren- u. Stengelfäule	Gibberella zeae (anamorph: Fusarium graminearum)
Graue Ährenfäule	Botryosphaeria zeae = Physalospora zeae (anamorph: Macrophoma zeae)
Gray leaf spot (Cercospora leaf spot)	Cercospora sorghi = C. sorghi var. maydis, C. zeae-maydis
Helminthosporium root rot	Exserohilum pedicellatum = Helminthosporium pedicellatum (teleomorph: Setosphaeria pedicellata)
Hormodendrum Ährenfäule (Cladosporium Fäule)	Cladosporium cladosporioides = Hormodendrum cladosporioides, C. herbarum (teleomorph: Mycosphaerella tassiana)
Leaf spots, minor	Alternaria alternata, Ascochyta maydis, A. tritici, A. zeicola, Bipolaris victoriae = Helminthosporium victoriae (teleomorph: Cochliobolus victoriae), C. sativus (anamorph: Bipolaris sorokiniana = H. sorokinianum = H. sativum), Epicoccum nigrum, Exserohilum prolatum = Drechslera prolata (teleomorph: Setosphaeria prolata) Graphium penicilliioides, Leptosphaeria maydis, Leptothyrium zeae, Ophiosphaerella herpotricha, (anamorph: Scolecosporella sp.), Paraphaeosphaeria michotii, Phoma sp., Septoria zeae, S. zeicola, S. zeina
Northern corn leaf blight (white blast, crown stalk rot, stripe)	Setosphaeria turcica (anamorph: Exserohilum turcicum = Helminthosporium turcicum)
Northern corn leaf spot Helminthosporium ear rot (race 1)	Cochliobolus carbonum (anamorph: Bipolaris zeicola = Helminthosporium carbonum)
Penicillium Ährenfäule (blue eye, blue mold)	Penicillium spp., P. chrysogenum, P. expansum, P. oxalicum
Phaeocystostroma Stengel- und Wurzelfäule	Phaeocystostroma ambiguum, = Phaeocystosporella zeae
Phaeosphaeria leaf spot	Phaeosphaeria maydis = Sphaerulina maydis
Physalospora Ährenfäule (Botryosphaeria Ährenfäule)	Botryosphaeria festucae = Physalospora zeicola (anamorph: Diplodia frumenti)

Erkrankung	Pathogen
Purple leaf sheath	Hemiparasitic bacteria and fungi
Pyrenochaeta Stengel- und Wurzelfäule	Phoma terrestris = Pyrenochaeta terrestris
Pythium Wurzelfäule	Pythium spp., P. arrhenomanes, P. graminicola
Pythium Stengelfäule	Pythium aphanidermatum = P. butleri L.
Red kernel disease (ear mold, leaf and seed rot)	Epicoccum nigrum
Rhizoctonia Ährenfäule (sclerotial rot)	Rhizoctonia zeae (teleomorph: Waitea circinata)
Rhizoctonia Wurzel- und Stengelfäule	Rhizoctonia solani, Rhizoctonia zeae
Wurzelfäulen (minor)	Alternaria alternata, Cercospora sorghii, Dictyochoeta fertilis, Fusarium acuminatum (teleomorph: Gibberella acuminata), F. equiseti (teleomorph: G. intricans), F. oxysporum, F. pallidoroseum, F. poeae, F. roseum, G. cyanogena, (anamorph: F. sulphureum), Microdochium bolleyi, Mucor sp., Periconia circinata, Phytophthora cactorum, P. drechsleri, P. nicotianae var. parasitica, Rhizopus arrhizus
Rostratum leaf spot (Helminthosporium leaf disease, ear and stalk rot)	Setosphaeria rostrata, (anamorph: Exserohilum rostratum = Helminthosporium rostratum)
Falscher Java Mehltau	Peronosclerospora maydis = Sclerospora maydis
Falscher Philippinen Mehltau	Peronosclerospora philippinensis = Sclerospora philippinensis
Falscher Sorghum Mehltau	Peronosclerospora sorghii = Sclerospora sorghii
Spontaneum downy mildew	Peronosclerospora spontanea = Sclerospora spontanea
Falscher Zuckerrohr-Mehltau	Peronosclerospora sacchari = Sclerospora sacchari
Sclerotium Ährenfäule (southern blight)	Sclerotium rolfsii Sacc. (teleomorph: Athelia rolfsii)
Seed rot-seedling blight	Bipolaris sorokiniana, B. zeicola = Helminthosporium carbonum, Diplodia maydis, Exserohilum pedicellatum, Exserohilum turcicum = Helminthosporium turcicum, Fusarium

Erkrankung	Pathogen
	avenaceum, F. culmorum, F. moniliforme, Gibberella zeae (anamorph: F. graminearum), Macrophomina phaseolina, Penicillium spp., Phomopsis sp., Pythium spp., Rhizoctonia solani, R. zeae, Sclerotium rolfsii, Spicaria sp.
Selenophoma leaf spot	Selenophoma sp.
Sheath rot	Gaeumannomyces graminis
Shuck rot	Myrothecium gramineum
Silage mold	Monascus purpureus, M. ruber
Flugbrand (Smut, common)	Ustilago zeae = U. maydis
Smut, false	Ustilaginoidea virens
Kolbenbrand (Smut, head)	Sphacelotheca reiliana = Sporisorium holcisorghi
Southern corn leaf blight and stalk rot	Cochliobolus heterostrophus (anamorph: Bipolaris maydis = Helminthosporium maydis)
Southern leaf spot	Stenocarpella macrospora = Diplodia macrospora
Stengelfäulen (minor)	Cercospora sorghi, Fusarium episphaeria, F. merismoides, F. oxysporum Schlechtend, F. poae, F. roseum, F. solani (teleomorph: Nectria haematococca), F. tricinctum, Mariannaea elegans, Mucor sp., Rhopoglyphus zeae, Spicaria sp.
Lagerfäulen (Storage rots)	Aspergillus spp., Penicillium spp. und weitere Pilze
Tar spot	Phyllachora maydis
Trichoderma ear rot and root rot	Trichoderma viride = T. lignorum teleomorph: Hypocrea sp.
White ear rot, root and stalk rot	Stenocarpella maydis = Diplodia zeae
Yellow leaf blight	Ascochyta ischaemi, Phyllosticta maydis (teleomorph: Mycosphaerella zeae-maydis)
Zonate leaf spot	Gloeocercospora sorghi

Tabelle 4: Erkrankungen hervorgerufen durch Pilze und Oomyceten mit unklarer Einstufung hinsichtlich biotrophen, hemibiotrophen bzw. nekrotrophen Verhaltens

Erkrankung	Pathogen
Hyalothyridium leaf spot	Hyalothyridium maydis
Late wilt	Cephalosporium maydis

5

Besonders bevorzugt sind

- Plasmodiophoromycota wie Plasmodiophora brassicae (Kohlhernie), Spongospora subterranea, Polymyxa graminis,
- Oomycota wie Bremia lactucae (Falscher Mehltau an Salat), Peronospora (Falscher Mehltau) bei Löwenmaul (P. antirrhini), Zwiebel (P. destructor), Spinat (P. effusa), Sojabohne (P. manchurica), Tabak (Blauschimmel; P. tabacina) Alfalfa und Klee (P. trifolium), Pseudoperonospora humuli (Falscher Mehltau an Hopfen), Plasmopara (Falscher Mehltau bei Trauben) (P. viticola) und Sonnenblume (P. halstedii), Sclerophthora macrospora (Falscher Mehltau bei Cerealien und Gräsern), Pythium (z.B. Wurzelbrand an Beta-Rübe durch P. debaryanum), Phytophthora infestans (Kraut- und Knollenfäule bei Kartoffel, Braunfäule bei Tomate etc.), Albugo spec.
- Ascomycota wie Microdochium nivale (Schneeschnitzel an Roggen und Weizen), Fusarium graminearum, Fusarium culmorum (Ährenfäule v.a. bei Weizen), Fusarium oxysporum (Fusarium-Welke an Tomate), Blumeria graminis (Echter Mehltau an Gerste (f.sp. hordei) und Weizen (f.sp. tritici)), Erysiphe pisi (Erbsenmehltau), Nectria galligena (Obstbaumkrebs), Unicnula necator (Echter Mehltau der Weinrebe), Pseudopeziza tracheiphila (Roter Brenner der Weinrebe), Claviceps purpurea (Mutterkorn an z.B. Roggen und Gräsern), Gaeumannomyces graminis (Schwarzbeinigkeit an Weizen, Roggen u.a. Gräsern), Magnaporthe grisea, Pyrenophora graminea (Streifenkrankheit an Gerste), Pyrenophora teres (Netzfleckenkrankheit an Gerste), Pyrenophora tritici-repentis (Blattfleckenkrankheit (Blattdürre) an Weizen), Venturia inaequalis (Apfelschorf), Sclerotinia sclerotium

(Weißstengeligkeit, Rapskrebs), *Pseudopeziza medicaginis* (Klappenschorf an Luzerne, Weiß- und Rotklee).

- 5 - Basidiomyceten wie *Typhula incarnata* (Typhula-Fäule an Gerste, Roggen, Weizen), *Ustilago maydis* (Beulenbrand an Mais), *Ustilago nuda* (Flugbrand an Gerste), *Ustilago tritici* (Flugbrand an Weizen, Dinkel), *Ustilago avenae* (Flugbrand an Hafer), *Rhizoctonia solani* (Wurzelstütter an Kartoffeln),  
10 *Sphacelotheca* spp. (Kolbenbrand bei Sorghum), *Melampsora lini* (Rost bei Flachs), *Puccinia graminis* (Schwarzrost an Weizen, Gerste, Roggen, Hafer), *Puccinia recondita* (Braunrost an Weizen), *Puccinia dispersa* (Braunrost an Roggen), *Puccinia hordei* (Braunrost an Gerste), *Puccinia coronata* (Kronenrost an Hafer), *Puccinia striiformis*  
15 (Gelbrost an Weizen, Gerste, Roggen sowie zahlreichen Gräsern), *Uromyces appendiculatus* (Bohnenrost), *Sclerotium rolfsii* (Wurzel- und Stengelfäule bei zahlreichen Pflanzen).
- 20 - Deuteromyceten (Fungi imperfecti) wie *Septoria* (*Stagonospora*) *nodorum* (Spelzenbräune) an Weizen (*Septoria tritici*), *Pseudocercospora herpotrichoides* (Halmbruchkrankheit an Weizen, Gerste, Roggen),  
25 *Rhynchosporium secalis* (Blattfleckenkrankheit an Roggen und Gerste), *Alternaria solani* (Dürrfleckenkrankheit an Kartoffel, Tomate), *Phoma betae* (Wurzelbrand an Beta-Rübe), *Cercospora beticola* (*Cercospora*-Blattfleckenkrankheit an Beta-Rübe), (*Alternaria brassicae* (Rapsschwärze an Raps, Kohl u.a. Kreuzblütlern), *Verticillium dahliae* (Rapswelke und -stengelfäule), *Colletotrichum lindemuthianum*  
30 (Brennfleckenkrankheit an Bohne), *Phoma lingam* - Umfallkrankheit (Schwarzbeinigkeit an Kohl; Wurzelhals- oder Stengelfäule an Raps), *Botrytis cinerea* (Grauschimmel an Weinrebe, Erdbeere, Tomate, Hopfen etc.).
- 35 Am meisten bevorzugt sind *Phytophthora infestans* (Kraut- und Knollenfäule, Braunfäule bei Tomate etc.), *Microdochium nivale* (vormals *Fusarium nivale*; Schneeschimmel an Roggen und Weizen), *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium avenaceum* und *Fusarium poae* (Ährenfäule an Weizen), *Fusarium oxysporum*  
40 (*Fusarium*-Welke an Tomate), *Magnaporthe grisea* (rice blast disease), *Sclerotinia sclerotium* (Weißstengeligkeit, Rapskrebs), *Septoria* (*Stagonospora*) *nodorum* und *Septoria tritici* (Spelzenbräune an Weizen), *Alternaria brassicae* (Rapsschwärze an Raps, Kohl u.a. Kreuzblütlern), *Phoma lingam* (Umfallkrankheit,

Schwarzbeinigkeit an Kohl; Wurzelhals- oder Stengelfäule an Raps).

## 2. Bakterielle Pathogene:

5

Beispielhaft jedoch nicht einschränkend seien die in Tabelle 5 genannten Pathogene und die mit ihnen in Zusammenhang gebrachten Erkrankungen zu nennen.

10

Tabelle 5: Bakterielle Erkrankungen

Erkrankung	Pathogen
Bacterial leaf blight and stalk rot	<i>Pseudomonas avenae</i> subsp. <i>avenae</i>
Bacterial leaf spot	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>holcicola</i>
Bakterielle Stengelfäule	<i>Enterobacter dissolvens</i> = <i>Erwinia dissolvens</i>
Schwarzbeinigkeit ("Bacterial stalk and top rot")	<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i> , <i>Erwinia chrysanthemi</i> pv. <i>zeae</i>
Bacterial stripe	<i>Pseudomonas andropogonis</i>
Chocolate spot	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>coronafaciens</i>
Goss's bacterial wilt and blight (leaf freckles and wilt)	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>nebraskensis</i> = <i>Corynebacterium michiganense</i> pv. <i>andnebraskense</i>
Holcus spot	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>
Purple leaf sheath	Hemiparasitic bacteria
Seed rot-seedling blight	<i>Bacillus subtilis</i>
Stewart's disease (bacterial wilt)	<i>Pantoea stewartii</i> = <i>Erwinia stewartii</i>
Corn stunt (achapparramiento, maize stunt, Mesa Central or Rio Grande maize stunt)	<i>Spiroplasma kunkelii</i>

Ganz besonders bevorzugt sind nachfolgende pathogene Bakterien: *Corynebacterium sepedonicum* (Bakterienringfäule an Kartoffel), *Erwinia carotovora* (Schwarzbeinigkeit an Kartoffel), *Erwinia amylovora* (Feuerbrand an Birne, Apfel, Quitte), *Streptomyces scabies* (Kartoffelschorf), *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (Wildfeuer an Tabak), *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (Fettfleckenkrankheit an Buschbohne), *Pseudomonas syringae* pv.

15

tomato ("bacterial speck" an Tomate), *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* (Blattfleckenkrankheit an Baumwolle) und *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* (Bakterienfäule an Reis und anderen Gräsern).

5

### 3. Virale Pathogene:

"Virale Pathogene" schließt sämtliche Pflanzenviren ein wie beispielsweise Tabak- oder oder Cucumber-Mosaic Virus, Ringspot-Virus, Nekrose-Virus, Mais Dwarf-Mosaic Virus etc.

10

Beispielhaft jedoch nicht einschränkend sind die in Tabelle 6 genannten Pathogene und die mit ihnen in Zusammenhang gebrachten Erkrankungen zu nennen.

15

Tabelle 6: Virale Erkrankungen

Krankheit	Pathogen
American wheat striate (wheat striate mosaic)	American wheat striate mosaic virus (AWSMV)
Barley stripe mosaic	Barley stripe mosaic virus (BSMV)
Barley yellow dwarf	Barley yellow dwarf virus (BYDV)
Brome mosaic	Brome mosaic virus (BMV)
Cereal chlorotic mottle	Cereal chlorotic mottle virus (CCMV)
Corn chlorotic vein banding (Brazilian maize mosaic)	Corn chlorotic vein banding virus (CCVBV)
Corn lethal necrosis	Viruskomplex aus Maize chlorotic mottle virus (MCMV) und Maize dwarf mosaic virus (MDMV) A oder B oder Wheat streak mosaic virus (WSMV)
Cucumber mosaic	Cucumber mosaic virus (CMV)
Cynodon chlorotic streak	Cynodon chlorotic streak virus (CCSV)
Johnsongrass mosaic	Johnsongrass mosaic virus (JGMV)
Maize bushy stunt	Mycoplasma-like organism (MLO) associated
Maize chlorotic dwarf	Maize chlorotic dwarf virus (MCDV)
Maize chlorotic mottle	Maize chlorotic mottle virus (MCMV)
Maize dwarf mosaic	Maize dwarf mosaic virus (MDMV) strains A, D, E and F
Maize leaf fleck	Maize leaf fleck virus (MLFV)
Maize line	Maize line virus (MLV)
Maize mosaic (corn leaf	Maize mosaic virus (MMV)

Krankheit	Pathogen
stripe, enanismo rayado)	
Maize mottle and chlorotic stunt	Maize mottle and chlorotic stunt virus
Maize pellucid ringspot	Maize pellucid ringspot virus (MPRV)
Maize raya gruesa	Maize raya gruesa virus (MRGV)
maize rayado fino (fine striping disease)	Maize rayado fino virus (MRFV)
Maize red leaf and red stripe	Mollicute
Maize red stripe	Maize red stripe virus (MRSV)
Maize ring mottle	Maize ring mottle virus (MRMV)
Maize rio IV	Maize rio cuarto virus (MRCV)
Maize rough dwarf (nanismo ruvido)	Maize rough dwarf virus (MRDV) (Cereal tillering disease virus)
Maize sterile stunt	Maize sterile stunt virus (strains of barley yellow striate virus)
Maize streak	Maize streak virus (MSV)
Maize stripe (maize chlorotic stripe, maize hoja blanca)	Maize stripe virus
Maize stunting	Maize stunting virus
Maize tassel abortion	Maize tassel abortion virus (MTAV)
Maize vein enation	Maize vein enation virus (MVEV)
Maize wallaby ear	Maize wallaby ear virus (MWEV)
Maize white leaf	Maize white leaf virus
Maize white line mosaic	Maize white line mosaic virus (MWLMV)
Millet red leaf	Millet red leaf virus (MRLV)
Northern cereal mosaic	Northern cereal mosaic virus (NCMV)
Oat pseudorosette (zakuklivanie)	Oat pseudorosette virus
Oat sterile dwarf	Oat sterile dwarf virus (OSDV)
Rice black-streaked dwarf	Rice black-streaked dwarf virus (RBSDV)
Rice stripe	Rice stripe virus (RSV)
Sorghum mosaic	Sorghum mosaic virus (SrMV) (auch: sugarcane mosaic virus (SCMV) Stämme H, I and M)
Sugarcane Fiji disease	Sugarcane Fiji disease virus (FDV)
Sugarcane mosaic	Sugarcane mosaic virus (SCMV) strains A, B, D, E, SC, BC, Sabi and MB (formerly MDMV-B)



Krankheit	Pathogen
Wheat spot mosaic	Wheat spot mosaic virus (WSMV)

#### 4. Tierische Schädlinge

##### 4.1 Insekten Pathogene:

5

Beispielhaft jedoch nicht einschränkend seien Insekten wie beispielsweise Käfer, Raupen, Läuse oder Milben zu nennen. Bevorzugt sind Insekten der Gattungen Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, Lepidoptera, Mallophaga, Homoptera, Hemiptera,

- 10 Orthoptera, Thysanoptera. Dermaptera, Isoptera, Anoplura, Siphonaptera, Trichoptera, etc.. Besonders bevorzugt sind Coleoptera and Lepidoptera Insekten, wie beispielsweise den Maiszünsler (European Corn Borer), *Diabrotica barberi*, *Diabrotica undecimpunctata*, *Diabrotica virgifera*, *Agrotis*
- 15 *ipsilon*, *Crymodes devastator*, *Feltia ducens*, *Agrotis gladiaria*, *Melanotus* spp., *Aeolus mellillus*, *Aeolus mancus*, *Horistonotus uhlerii*, *Sphenophorus maidis*, *Sphenophorus zeae*, *Sphenophorus parvulus*, *Sphenophorus callosus*, *Phyllogphaga* spp., *Anuraphis maidiradicis*, *Delia platura*, *Colaspis brunnea*, *Stenolophus*
- 20 *lecontei* und *Clivinia impressifrons*.

Ferner sind zu nennen: Das Getreidehähnchen (*Oulema melanopus*), die Fritfliege (*Oscinella frit*), Drahtwürmer (*Agrotis lineatus*) und Blattläuse (wie z.B. Haferblattlaus *Rhopalosiphum padi*,

25 Grosse Getreideblattlaus *Sitobion avenae*).

##### 4.2 Nematoden:

- Beispielhaft jedoch nicht einschränkend seien die in Tabelle 7
- 30 genannten Pathogene und die mit ihnen in Zusammenhang gebrachten Erkrankungen zu nennen.

Tabelle 7: Parasitäre Nematoden

Schädigung	Pathogene Nematode
Awl	Dolichodorus spp., D. heterocephalus
Stengel- oder Stockälchen, Rübenkopfälchen	Ditylenchus dipsaci
Burrowing	Radopholus similis
Haferzystenälchen	Heterodera avenae, H. zeae, Punctodera chalcensis
Dagger	Xiphinema spp., X. americanum, X. mediterraneum
False root-knot	Nacobbus dorsalis
Lance, Columbia	Hoplolaimus columbus
Lance	Hoplolaimus spp., H. galeatus
Lesion	Pratylenchus spp., P. brachyurus, P. crenatus, P. hexincisus, P. neglectus, P. penetrans, P. scribneri, P. thornei, P. zeae
Needle	Longidorus spp., L. breviannulatus
Ring	Criconemella spp., C. ornata
Wurzelgallenälchen	Meloidogyne spp., M. chitwoodi, M. incognita, M. javanica
Spiral	Helicotylenchus spp.
Sting	Belonolaimus spp., B. longicaudatus
Stubby-root	Paratrichodorus spp., P. christiei, P. minor, Quinisulcius acutus, Trichodorus spp.
Stunt	Tylenchorhynchus dubius

- Ganz besonders bevorzugt sind Globodera rostochiensis und
- 5 G. pallida (Zystenälchen an Kartoffel, Tomate u.a. Nachtschattengewächsen), Heterodera schachtii (Rübenzystenälchen an Zucker- und Futterrübe, Raps, Kohl etc.), Heterodera avenae (Haferzystenälchen an Hafer u.a. Getreidearten), Ditylenchus dipsaci (Stengel- oder Stockälchen, Rübenkopfälchen an Roggen, Hafer, Mais, Klee, Tabak, Rübe), Anguina tritici (Weizenälchen, Radekrankheit an Weizen (Dinkel, Roggen), Meloidogyne hapla (Wurzelgallenälchen an Möhre, Gurke, Salat, Tomate, Kartoffel, Zuckerrübe, Luzerne).
- 10
- 15 Als für die einzelnen Sorten bevorzugte Pilz- oder Virus-Pathogene sind beispielsweise zu nennen:

## 1. Gerste:

- 5 Pilz-, bakterielle und virale Pathogene: *Puccinia graminis* f.sp. *hordei*, *Blumeria* (*Erysiphe*) *graminis* f.sp. *hordei*, barley yellow dwarf virus (BYDV),

- 10 Pathogene Insekten / Nematoden: *Ostrinia nubilalis* (European corn borer); *Agrotis ipsilon*; *Schizaphis graminum*; *Blissus leucopterus leucopterus*; *Acrosternum hilare*; *Euschistus servus*; *Delia platyura*; *Mayetiola destructor*; *Petrobia latens*.

## 2. Sojabohne:

- 15 Pilz-, bakterielle oder virale Pathogene: *Phytophthora megasperma* fsp.glycinea, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium oxysporum*, *Diaporthe phaseolorum* var. *sojae* (*Phomopsis sojae*), *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*, *Sclerotium rolfsii*, *Cercospora kikuchii*,  
20 *Cercospora sojae*, *Peronospora manshurica*, *Colletotrichum dematium* (*Colletotrichum truncatum*), *Corynespora cassiicola*, *Septoria glycines*, *Phyllosticta sojicola*, *Alternaria alternata*, *Pseudomonas syringae* p.v. *glycinea*, *Xanthomonas campestris* p.v. *phaseoli*, *Microsphaera diffusa*, *Fusarium semitectum*,  
25 *Phialophora gregata*, Sojabohnen Mosaikvirus, *Glomerella glycines*, Tobacco Ring spot virus, Tobacco Streak virus, *Phakopsora pachyrhizi*, *Pythium aphanidermatum*, *Pythium ultimum*, *Pythium debaryanum*, Tomato spotted wilt virus, *Heterodera glycines* *Fusarium solani*.

- 30 Pathogene Insekten / Nematoden: *Pseudoplusia includens*; *Anticarsia gemmatilis*; *Plathypena scabra*; *Ostrinia nubilalis*; *Agrotis ipsilon*; *Spodoptera exigua*; *Heliothis virescens*; *Helicoverpa zea*; *Epilachna varivestis*; *Myzus persicae*; *Empoasca fabae*; *Acrosternum hilare*; *Melanoplus femurrubrum*; *Melanoplus differentialis*; *Hylemya platura*; *Sericothrips variabilis*; *Thrips tabaci*; *Tetranychus turkestani*; *Tetranychus urticae*;

## 3. Raps:

- 40 Pilz-, bakterielle oder virale Pathogene: *Albugo candida*, *Alternaria brassicae*, *Leptosphaeria maculans*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Mycosphaerella brassicicola*,

*Pythium ultimum*, *Peronospora parasitica*, *Fusarium roseum*,  
*Alternaria alternata*.

4. Alfalfa:

5

Pilz-, bakterielle oder virale Pathogene: *Clavibacter michiganense* subsp. *insidiosum*, *Pythium ultimum*, *Pythium irregulare*, *Pythium splendens*, *Pythium debaryanum*, *Pythium aphanidermatum*, *Phytophthora megasperma*, *Peronospora trifoliorum*, *Phoma medicaginis* var. *medicaginis*, *Cercospora medicaginis*, *Pseudopeziza medicaginis*, *Leptotrochila medicaginis*, *Fusarium*, *Xanthomonas campestris* p.v. *alfalfae*, *Aphanomyces euteiches*, *Stemphylium herbarum*, *Stemphylium alfalfae*.

15

5. Weizen:

Pilz-, bakterielle oder virale Pathogene: *Pseudomonas syringae* p.v. *atrofaciens*, *Urocystis agropyri*, *Xanthomonas campestris* p.v. *translucens*, *Pseudomonas syringae* p.v. *syringae*, *Alternaria alternata*, *Cladosporium herbarum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium avenaceum*, *Fusarium culmorum*, *Ustilago tritici*, *Ascochyta tritici*, *Cephalosporium gramineum*, *Collotetrichum graminicola*, *Erysiphe graminis* f.sp. *tritici*, *Puccinia graminis* f.sp. *tritici*, *Puccinia recondita* f.sp. *tritici*, *Puccinia striiformis*, *Pyrenophora tritici-repentis*, *Septoria* (*Stagonospora*) *nodorum*, *Septoria tritici*, *Septoria avenae*, *Pseudocercospora herpotrichoides*, *Rhizoctonia solani*, *Rhizoctonia cerealis*, *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, *Pythium aphanidermatum*, *Pythium arrhenomanes*, *Pythium ultimum*, *Bipolaris sorokiniana*, Barley Yellow Dwarf Virus, Brome Mosaic Virus, Soil Borne Wheat Mosaic Virus, Wheat Streak Mosaic Virus, Wheat Spindle Streak Virus, American Wheat Striate Virus, *Claviceps purpurea*, *Tilletia tritici*, *Tilletia laevis*, *Ustilago tritici*, *Tilletia indica*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium arrhenomanes*, *Pythium graminicola*, *Pythium aphanidermatum*, High Plains Virus, European Wheat Striate Virus, *Puccinia graminis* f.sp. *tritici* (Wheat stem rust), *Blumeria* (*Erysiphe*) *graminis* f.sp. *tritici* (Wheat Powdery Mildew).

40

Pathogene Insekten / Nematoden: *Pseudaletia unipunctata*; *Spodoptera frugiperda*; *Elasmopalpus lignosellus*; *Agrotis orthogonia*; *Elasmopalpus lignosellus*; *Oulema melanopus*; *Hypera punctata*; *Diabrotica undecimpunctata howardi*; Russian wheat

aphid; *Schizaphis graminum*; *Macrosiphum avenae*; *Melanoplus femurrubrum*; *Melanoplus differentialis*; *Melanoplus sanguinipes*; *Mayetiola destructor*; *Sitodiplosis mosellana*; *Meromyza americana*; *Hylemya coarctata*; *Frankliniella fusca*; *Cephus*  
5 *cinctus*; *Aceria tulipae*;

6. Sonnenblume:

Pilz-, bakterielle oder virale Pathogene: *Plasmophora halstedii*,  
10 *Sclerotinia sclerotiorum*, Aster Yellows, *Septoria helianthi*,  
*Phomopsis helianthi*, *Alternaria helianthi*, *Alternaria zinniae*,  
*Botrytis cinerea*, *Phoma macdonaldii*, *Macrophomina phaseolina*,  
*Erysiphe cichoracearum*, *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus arrhizus*,  
*Rhizopus stolonifer*, *Puccinia helianthi*, *Verticillium dahliae*,  
15 *Erwinia carotovorum* p.v. *Carotovora*, *Cephalosporium acremonium*,  
*Phytophthora cryptogea*, *Albugo tragopogonis*.

Pathogene Insekten / Nematoden: *Suleima helianthana*; *Homoeosoma electellum*; *zygogramma exclamationis*; *Bothyrus gibbosus*;  
20 *Neolasioptera murtfeldtiana*;

7. Mais:

Pilz-, bakterielle oder virale Pathogene: *Fusarium moniliforme*  
25 var. *subglutinans*, *Erwinia stewartii*, *Fusarium moniliforme*,  
*Gibberella zeae* (*Fusarium graminearum*), *Stenocarpella maydis*  
(*Diplodia maydis*), *Pythium irregulare*, *Pythium debaryanum*,  
*Pythium graminicola*, *Pythium splendens*, *Pythium ultimum*, *Pythium aphanidermatum*,  
*Aspergillus flavus*, *Bipolaris maydis* 0, T  
30 (*Cochliobolus heterostrophus*), *Helminthosporium carbonum* I, II &  
III (*Cochliobolus carbonum*), *Exserohilum turcicum* I, II & III,  
*Helminthosporium pedicellatum*, *Physoderma maydis*, *Phyllosticta maydis*,  
*Kabatiella maydis*, *Cercospora sorghi*, *Ustilago maydis*,  
*Puccinia sorghi*, *Puccinia polysora*, *Macrophomina phaseolina*,  
35 *Penicillium oxalicum*, *Nigrospora oryzae*, *Cladosporium herbarum*,  
*Curvularia lunata*, *Curvularia inaequalis*, *Curvularia pallescens*,  
*Clavibacter michiganense* subsp. *nebraskense*, *Trichoderma viride*,  
Maize Dwarf Mosaic Virus A & B, Wheat Streak Mosaic Virus, Maize  
Chlorotic Dwarf Virus, *Claviceps sorghi*, *Pseudonomas avenae*,  
40 *Erwinia chrysanthemi* p.v. *Zea*, *Erwinia carotovora*, Corn stunt  
*spiroplasma*, *Diplodia macrospora*, *Sclerophthora macrospora*,  
*Peronosclerospora sorghi*, *Peronosclerospora philippinesis*,  
*Peronosclerospora maydis*, *Peronosclerospora sacchari*,  
*Spacelotheca reiliana*, *Physopella zeae*, *Cephalosporium maydis*,

Caphalosporium acremonium, Maize Chlorotic Mottle Virus, High Plains Virus, Maize Mosaic Virus, Maize Rayado Fino Virus, Maize Streak Virus (MSV, Maisstrichel-Virus), Maize Stripe Virus, Maize Rough Dwarf Virus.

5

Pathogene Insekten / Nematoden: Ostrinia nubilalis; Agrotis ipsilon; Helicoverpa zea; Spodoptera frugiperda; Diatraea grandiosella; Elasmopalpus lignosellus; Diatraea saccharalis; Diabrotica virgifera; Diabrotica longicornis barberi; Diabrotica undecimpunctata howardi; Melanotus spp.; Cyclocephala borealis; Cyclocephala immaculata; Popillia japonica; Chaetocnema pulicaria; Sphenophorus maidis; Rhopalosiphum maidis; Anuraphis maidiradicis; Blissus leucopterus leucopterus; Melanoplus femurrubrum; Melanoplus sanguinipes; Hylemya platura; Agromyza parvicornis; Anaphothrips obscurus; Solenopsis milesta; Tetranychus urticae.

#### 8. Sorghum:

20 Pilz-, bakterielle oder virale Pathogene: Exserohilum turcicum, Colletotrichum graminicola (Glomerella graminicola), Cercospora sorghi, Gloeocercospora sorghi, Ascochyta sorghina, Pseudomonas syringae p.v. syringae, Xanthomonas campestris p.v. holcicola, Pseudomonas andropogonis, Puccinia purpurea, Macrophomina phaseolina, Perconia circinata, Fusarium moniliforme, Alternaria alternate, Bipolaris sorghicola, Helminthosporium sorghicola, Curvularia lunata, Phoma insidiosa, Pseudomonas avenae (Pseudomonas alboprecipitans), Ramulispora sorghi, Ramulispora sorghicola, Phyllachara sacchari, Sporisorium reilianum  
 25 (Sphacelotheca reiliana), Sphacelotheca cruenta, Sporisorium sorghi, Sugarcane mosaic H, Maize Dwarf Mosaic Virus A & B, Claviceps sorghi, Rhizoctonia solani, Acremonium strictum, Sclerophthora macrospora, Peronosclerospora sorghi, Peronosclerospora philippinensis, Sclerospora graminicola,  
 30 Fusarium graminearum, Fusarium oxysporum, Pythium arrhenomanes, Pythium graminicola.

Pathogene Insekten / Nematoden: Chilo partellus; Spodoptera frugiperda; Helicoverpa zea; Elasmopalpus lignosellus; Feltia subterranea; Phyllophaga crinita; Eleodes, Conoderus und Aeolus spp.; Oulema melanopus; Chaetocnema pulicaria; Sphenophorus maidis; Rhopalosiphum maidis; Siphiaflava; Blissus leucopterus leucopterus; Contarinia sorghicola; Tetranychus cinnabarinus; Tetranychus urticae.

## 9. Baumwolle:

- Pathogene Insekten / Nematoden: *Heliothis virescens*; *Helicoverpa*  
 5 *zea*; *Spodoptera exigua*; *Pectinophora gossypiella*; *Anthonomus*  
*grandis grandis*; *Aphis gossypii*; *Pseudatomoscelis seriatus*;  
*Trialeurodes abutilonea*; *Lygus lineolaris*; *Melanoplus*  
*femurrubrum*; *Melanoplus differentialis*; *Thrips tabaci* (onion  
 thrips); *Frankliniella fusca*; *Tetranychus cinnabarinus*;  
 10 *Tetranychus urticae*.

## 10. Reis:

- Pathogene Insekten / Nematoden: *Diatraea saccharalis*; *Spodoptera*  
 15 *frugiperda*; *Helicoverpa zea*; *Colaspis brunnea*; *Lissorhoptrus*  
*oryzophilus*; *Sitophilus oryzae*; *Nephotettix nigropictus*; *Blissus*  
*leucopterus leucopterus*; *Acrosternum hilare*.

## 11. Raps:

- 20 Pathogene Insekten / Nematoden: *Brevicoryne brassicae*;  
*Phylotreta cruciferae*; *Mamestra conjugurata*; *Plutella*  
*xylostella*; *Delia ssp.*
- 25 "BI1-Protein" meint im Rahmen der Erfindung Polypeptide die  
 mindestens eine Sequenz die eine Homologie von mindestens 50%,  
 bevorzugt mindestens 80%, besonders bevorzugt mindestens 90%,  
 ganz besonders bevorzugt 100% aufweisen zu einem BI1-  
 Konsensusmotiv ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus
- 30 a) H(L/I)KXVY  
 b) AXGA(Y/F)XH  
 c) NIGG  
 d) P(V/P)(Y/F)E(E/Q)(R/Q)KR  
 35 e) (E/Q)G(A/S)S(V/I)GPL  
 f) DP(S/G)(L/I)(I/L)  
 g) V(G/A)T(A/S)(L/I)AF(A/G)CF(S/T)  
 h) YL(Y/F)LGG, bevorzugt EYLYLGG  
 i) L(L/V)SS(G/W)L(S/T)(I/M)L(L/M)W  
 40 j) DTGX(I/V)(I/V)E

Besonders bevorzugt ist dabei das BI- Konsensusmotiv f)  
 YL(Y/F)LGG, ganz besonders bevorzugt (EYLYLGG). Dieses Motiv ist  
 charakteristisch für pflanzliche BI1-Proteine.

Besonders bevorzugt kommen Sequenzen mit Homologie zu mindestens 2 oder 3 dieser Motive (a bis g) in einem BI1-Protein vor, ganz besonders bevorzugt mindestens 4 oder 5, am meisten bevorzugt alle Motive a bis j. Weitere BI1 typischen Sequenzmotive kann der Fachmann unschwer aus dem Sequenzvergleich von BI1-Proteine - wie in Fig. 1 oder 6 dargestellt - ableiten.

Insbesondere bevorzugt sind BI-Proteine, die kodiert werden durch ein Polypeptid das mindestens eine Sequenz umfaßt ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:

- a) den Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32 und 38, und
- b) Sequenzen, die eine Identität von mindestens 50%, bevorzugt mindestens 70%, besonders bevorzugt mindestens 90%, ganz besonders bevorzugt mindestens 95% zu einer der Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32 und 38 aufweisen,
- c) Sequenzen die mindestens eine Teilsequenz von mindestens 10, bevorzugt 20, besonders bevorzugt 50 zusammenhängenden Aminosäureresten einer der Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32 und 38 umfassen.

Erfindungsgemäß von dem Begriff BI-Protein umfasst sind insbesondere natürliche oder künstliche Mutationen der BI1-Polypeptide gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10 und 38 sowie homologe Polypeptide aus anderen Organismen, bevorzugt Pflanzen, welche weiterhin im wesentlichen gleiche Eigenschaften aufweisen. Mutationen umfassen Substitutionen, Additionen, Deletionen, Inversion oder Insertionen eines oder mehrerer Aminosäurereste.

Umfaßt sind insofern auch Ausführungsformen unter Verwendung von BI1-Proteinen aus nicht-pflanzlichen Organismen wie beispielsweise Mensch (GenBank Acc.-No.: P55061), Ratte (GenBank Acc.-No.: P55062) oder Drosophila (GenBank Acc.-No.: Q9VSH3). Zwischen pflanzlichen und nicht-pflanzlichen BI1-Proteinen konservierte Motive können durch Sequenzvergleiche leicht identifiziert werden (vgl. Alignment in Bolduc et al. (2003) Planta 216:377-386; Fig. 1 und 6).



Somit werden beispielsweise auch solche Polypeptide durch die vorliegende Erfindung mit umfaßt, welche man durch Modifikation eines Polypeptides gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10 und 38 erhält.

5

Die zu den im Rahmen dieser Erfindung offenbarten BI1-Sequenzen homologen Sequenzen aus anderen Pflanzen können z.B. durch

10 a) Datenbanksuche in Banken von Organismen, deren genomische oder cDNA Sequenz ganz oder teilweise bekannt ist, unter Verwendung der bereitgestellten BI1-Sequenzen als Suchsequenz oder

15 b) Durchmustern von Gen- oder cDNA-Bibliotheken unter Verwendung der bereitgestellten BI1-Sequenzen als Sonde -

aufgefunden werden. Die Durchmusterung von cDNA- oder genomischen Bibliotheken (beispielsweise unter Verwendung einer der unter SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 20 25, 27, 29, 31 und 37 beschriebene Nukleinsäuresequenzen oder Teilen derselben als Sonde), ist ein dem Fachmann geläufiges Verfahren, um Homologe in anderen Arte zu identifizieren. Dabei haben die von den Nukleinsäuresequenzen gemäß SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31 und 37 25 abgeleiteten Sonden eine Länge von mindestens 20 bp, bevorzugt mindestens 50 bp, besonders bevorzugt mindestens 100 bp, ganz besonders bevorzugt mindestens 200 bp, am meisten bevorzugt mindestens 400 bp. Für die Durchmusterung der Bibliotheken kann auch ein zu den unter SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 30 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31 und 37 beschriebenen Sequenzen komplementärer DNA-Strang eingesetzt werden.

Unter Homologie zwischen zwei Nukleinsäuresequenzen wird die Identität der Nukleinsäuresequenz über die jeweils gesamte 35 Sequenzlänge verstanden, die durch Vergleich mit Hilfe des Programmalgorithmus GAP (Wisconsin Package Version 10.0, University of Wisconsin, Genetics Computer Group (GCG), Madison, USA; Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389ff) unter Einstellung folgender Parameter berechnet wird:

40

Gap Weight: .50

Length Weight: 3

Average Match: 10

Average Mismatch: 0

Beispielhaft wird unter einer Sequenz, die eine Homologie von mindestens 80 % auf Nukleinsäurebasis mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 aufweist, eine Sequenz verstanden, die bei einem Vergleich mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 nach obigem

5    Programmalgorithmus mit obigem Parametersatz eine Homologie von  
mindestens 80 % aufweist.

Unter Homologie zwischen zwei Polypeptiden wird die Identität der Aminosäuresequenz über die jeweils gesamte Sequenzlänge verstanden, die durch Vergleich mit Hilfe des Programmalgorithmus GAP (Wisconsin Package Version 10.0, University of Wisconsin, Genetics Computer Group (GCG), Madison, USA) unter Einstellung folgender Parameter berechnet wird:

15            Gap Weight: 8

Length Weight: 2

Average Match: 2,912

Average Mismatch:-2,003

20 Beispielhaft wird unter einer Sequenz, die eine Homologie von mindestens 80 % auf Proteinbasis mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 aufweist, eine Sequenz verstanden, die bei einem Vergleich mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 nach obigem Programmalgorithmus mit obigem Parametersatz eine Homologie von mindestens 80 % aufweist.

25 BI1-Proteine umfassen auch solche Polypeptide die durch  
Nukleinsäuresequenzen kodiert werden, die unter  
Standardbedingungen mit einer der durch SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7,  
9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31 und 37 beschrie-  
30 benen BI1 Nukleinsäuresequenz, der zu ihr komplementären  
Nukleinsäuresequenz oder Teilen der vorgenannten hybridisieren  
und die gleichen wesentlichen Eigenschaften wie die unter SEQ ID  
NO: 2, 4, 6, 8, 10 und 38 beschriebenen Proteine haben.

35 Der Begriff "Standardhybridisierungsbedingungen" ist breit zu  
verstehen und meint stringente als auch weniger stringente  
Hybridisierungsbedingungen. Solche Hybridisierungsbedingungen  
sind unter anderem bei Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T et  
al., in Molecular Cloning (A Laboratory Manual), 2. Auflage,  
40 Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Seiten 9.31-9.57)  
oder in Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley  
& Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. beschrieben. Beispielhaft  
können die Bedingungen während des Waschschrilles ausgewählt  
sein aus dem Bereich von Bedingungen begrenzt von solchen mit

geringer Stringenz (mit ungefähr 2X SSC bei 50°C) und solchen mit hoher Stringenz (mit ungefähr 0.2X SSC bei 50°C bevorzugt bei 65°C) (20X SSC: 0,3M Natriumcitrat, 3M NaCl, pH 7.0).

5 Darüber hinaus kann die Temperatur während des Waschschruttes von niedrig stringenten Bedingungen bei Raumtemperatur, ungefähr 22°C, bis zu stärker stringenten Bedingungen bei ungefähr 65°C angehoben werden. Beide Parameter, Salzkonzentration und Temperatur, können gleichzeitig variiert werden, auch kann einer der beiden Parameter konstant gehalten und nur der andere  
10 variiert werden. Während der Hybridisierung können auch denaturierende Agenzien wie zum Beispiel Formamid oder SDS eingesetzt werden. In Gegenwart von 50% Formamid wird die Hybridisierung bevorzugt bei 42°C ausgeführt.

15 "Wesentliche Eigenschaften" meint in Bezug auf ein BI-Protein beispielsweise eine oder mehr nachfolgender Eigenschaften:

- a) Verleihung oder Steigerung der Pathogenresistenz gegen  
20 zumindest ein Pathogen bei Erhöhung Proteinmenge oder Funktion des besagten BI-Proteins in mindestens einem Gewebe der Pflanze, wobei besagtes Gewebe nicht die Blattepidermis ist.
- b) Ausbleiben eines spontan-induzierten Zelltodes bei Erhöhung  
25 der Proteinmenge oder Funktion des besagten BI-Proteins
- c) Die Eigenschaft bei transienter co-Transfektion von Bax mit besagtem BI1-Protein beispielsweise in HEK293 Zellen die BAX-induzierte Apoptose signifikant zu inhibieren.  
30 Entsprechende Verfahren sind beschrieben (Bolduc N et al. (2003) Planta 216:377-386).
- d) Das Vorliegen von fünf bis sieben putativen  
35 Transmembrandomänen innerhalb der besagten BI1-Proteins.
- e) Eine präferentielle Lokalisation in Zellmembranen, insbesondere der Kernhüll-, ER- und/oder Thylakoidmembran.

40 Dabei kann die quantitative Ausprägung besagter Eigenschaften eines BI1-Proteins nach unten als auch nach oben im Vergleich zu einem Wert erhalten für das BI1-Protein gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10 oder 38 abweichen.

Der Begriff "Erhöhung der BII Proteinmenge oder Funktion" ist im Rahmen dieser Erfindung breit zu verstehen und kann auf unterschiedlichen zellbiologischen Mechanismen beruhen.

- 5 "Proteinmenge" meint die Menge eines BII-Proteins in dem jeweils angegebenen Organismus, Gewebe, Zelle oder Zellkompartiment.

"Erhöhung der Proteinmenge" meint die mengenmäßige Erhöhung der Menge eines BII-Proteins in dem jeweils angegebenen Organismus,  
10 Gewebe, Zelle oder Zellkompartiment. - beispielsweise durch eines der unten beschriebenen Verfahren - im Vergleich zu dem Wildtyp derselben Gattung und Art auf den dieses Verfahren nicht angewendet wurde, aber unter ansonst gleichen Rahmenbedingungen (wie beispielsweise Kulturbedingungen, Alter der Pflanzen etc.).  
15 Die Erhöhung beträgt dabei mindestens 10 %, bevorzugt mindestens 30 % oder mindestens 50 %, besonders bevorzugt mindestens 70 % oder 100 %, ganz besonders bevorzugt um mindestens 200 % oder 500 %, am meisten bevorzugt um mindestens 1000 %. Die Bestimmung der Proteinmenge kann durch verschiedene dem Fachmann geläufige  
20 Verfahren erfolgen. Beispielhaft jedoch nicht einschränkend seien zu nennen: Das Mikro-Biuret Verfahren (Goa J (1953) Scand J Clin Lab Invest 5:218-222), die Folin-Ciocalteu-Methode (Lowry OH et al. (1951) J Biol Chem 193:265-275) oder die Messung der Adsorption von CBB G-250 (Bradford MM (1976) Analyt Biochem  
25 72:248-254). Ferner kann eine Quantifizierung über immunologische Methoden wie beispielsweise Western-Blot erfolgen. Die Herstellung entsprechender BII-Antikörper sowie die Durchführung von BII-Western-Blots ist beschrieben (Bolduc et al. (2002) FEBS Lett 532:111-114). Eine indirekte  
30 Quantifizierung kann über Northern-Blots realisiert werden, wobei die mRNA Menge in der Regel gut mit der resultierenden Proteinmenge korreliert. Entsprechende Verfahren sind beschrieben (u.a. Bolduc et al. (2003) Planta 216:377-386; Matsumura H et al. (2003) Plant J 33:425-434).

- 35 "Funktion" meint bevorzugt die Eigenschaft eines BII-Proteins den spontan-induzierten Zelltodes zu vermindern und/oder die Eigenschaft, die apoptose-indizierende Wirkung von Bax zu inhibieren. Entsprechende Funktionen zählen zu den wesentlichen  
40 Eigenschaft eines BII-Proteins.

"Erhöhung" der Funktion meint im Rahmen dieser Erfindung beispielsweise die mengenmäßige Steigerung der inhibitorischen Wirkung auf den Bax-induzierten apoptotischen Zelltod, welche

durch dem Fachmann geläufige Verfahren quantifiziert werden kann (s.o.) Der Erhöhung beträgt dabei mindestens 10 %, bevorzugt mindestens 30 % oder mindestens 50 %, besonders bevorzugt mindestens 70 % oder 100 %, ganz besonders bevorzugt um  
5 mindestens 200 % oder 500 %, am meisten bevorzugt um mindestens 1000 %. Verfahren zur Erhöhung der Funktion umfassen neben den oben beschriebenen Verfahren zur Erhöhung der Proteinmenge (die auch immer die Funktion erhöht) ferner beispielhaft - jedoch nicht einschränkend - insbesondere das Einführen von Mutationen  
10 in ein BII-Protein.

Die BII-Proteinmenge kann beispielhaft jedoch nicht einschränkend durch eines der nachfolgenden Verfahren erhöht werden:

- 15 a) Rekombinante Expression oder Überexpression eines BII-Proteins durch Einringen einer rekombinanten Expressionskassette umfassend eine Nukleinsäuresequenz kodierend für ein BII-Protein unter Kontrolle eines  
20 gewebespezifischen Promotors, wobei besagter Promotor im wesentlichen keine Aktivität in der Blattepidermis aufweist.
- b) Modifikation (z.B. Austausch) der regulatorischen Regionen (z.B. der Promotorregion) eines endogenen BII-Gens  
25 beispielsweise Austausch gegen einen gewebespezifischen Promotor mittels homologer Rekombination, wobei besagter Promotor im wesentlichen keine Aktivität in der Blattepidermis aufweist.
- 30 c) Insertion einer Nukleinsäuresequenz kodierend für ein BII-Protein in das pflanzliche Genom hinter einen gewebespezifischen Promotor mittels homologer Rekombination, wobei besagter Promotor im wesentlichen keine Aktivität in der Blattepidermis aufweist.
- 35 d) Erhöhung der Expression eines endogenen BII-Proteins durch Einbringen eines Transkriptionsfaktors (z.B. eines artifiziellen Transkriptionsfaktors aus der Klasse der Zinkfingerproteine) geeignet zur Induktion der Expression  
40 besagten BII-Proteins. Bevorzugt ist das Einringen einer rekombinanten Expressionskassette umfassend eine Nukleinsäuresequenz kodierend für besagten Transkriptionsfaktor unter Kontrolle eines gewebespezifischen

Promotors, wobei besagter Promotor im wesentlichen keine Aktivität in der Blattepidermis aufweist.

- Der Begriff "Einbringen" umfaßt im Rahmen der Erfindung
- 5 allgemein alle Verfahren, die dazu geeignet die einzubringende Verbindung, direkt oder indirekt, in eine Pflanze oder eine Zelle, Kompartiment, Gewebe, Organ oder Samen derselben einzuführen oder dort zu generieren. Direkte und indirekte Verfahren sind umfaßt. Die Einbringen kann zu einer
- 10 vorübergehenden (transienten) Präsenz besagter Verbindung führen oder aber auch zu einer dauerhaften (stabilen) oder induzierbaren. Einführen umfaßt beispielsweise Verfahren wie Transfektion, Transduktion oder Transformation.
- 15 In den im Rahmen der Erfindung zum Einsatz kommenden rekombinanten Expressionskassetten steht ein Nukleinsäuremolekül (beispielsweise kodierend für ein Btl-Protein) in funktioneller Verknüpfung mit mindestens einem gewebespezifischen Promotor, wobei besagter Promotor im wesentlichen keine Aktivität in der
- 20 Blattepidermis aufweist und wobei der Promotor in Bezug auf die zu exprimierende Nukleinsäuresequenz heterolog ist d.h. natürlicherweise nicht mit derselben kombiniert vorkommt. Die erfindungsgemäßen rekombinanten Expressionskassetten können optional weitere genetische Kontrollelement umfassen.
- 25 Unter einer funktionellen Verknüpfung versteht man zum Beispiel die sequentielle Anordnung des besagten Promotors mit der zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz und ggf. weiterer regulativer Elemente wie zum Beispiel einem Terminator derart, dass jedes
- 30 der regulativen Elemente seine Funktion bei der rekombinanten Expression der Nukleinsäuresequenz erfüllen kann. Dazu ist nicht unbedingt eine direkte Verknüpfung im chemischen Sinne erforderlich. Genetische Kontrollsequenzen, wie zum Beispiel Enhancer-Sequenzen, können ihre Funktion auch von weiter
- 35 entfernten Positionen oder gar von anderen DNA-Molekülen aus auf die Zielsequenz ausüben. Bevorzugt sind Anordnungen, in denen die rekombinant zu exprimierende Nukleinsäuresequenz hinter der als Promoter fungierenden Sequenz positioniert wird, so dass beide Sequenzen kovalent miteinander verbunden sind. Bevorzugt
- 40 ist dabei der Abstand zwischen der Promotorsequenz und der rekombinant zu exprimierende Nukleinsäuresequenz geringer als 200 Basenpaare, besonders bevorzugt kleiner als 100 Basenpaare, ganz besonders bevorzugt kleiner als 50 Basenpaare. Die Herstellung einer funktionellen Verknüpfung als auch die

Herstellung einer rekombinanten Expressionskassette kann mittels gängiger Rekombinations- und Klonierungstechniken realisiert werden, wie sie beispielsweise in Maniatis T, Fritsch EF und Sambrook J (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (NY), in Silhavy TJ, Berman ML und Enquist LW (1984) Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (NY), in Ausubel FM et al. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience und bei 10 Gelvin et al. (1990) In: Plant Molecular Biology Manual beschrieben sind. Zwischen beide Sequenzen können aber auch weitere Sequenzen positioniert werden, die zum Beispiel die Funktion eines Linkers mit bestimmten Restriktionsenzymchnittstellen oder eines Signalpeptides haben. 15 Auch kann die Insertion von Sequenzen zur Expression von Fusionsproteinen führen.

Bevorzugt kann die rekombinante Expressionskassette, bestehend aus einer Verknüpfung von Promoter und zu exprimierender 20 Nukleinsäuresequenz, integriert in einem Vektor vorliegen und durch zum Beispiel Transformation in ein pflanzliches Genom insertiert werden.

Unter einer rekombinanten Expressionskassette sind aber auch 25 solche Konstruktionen zu verstehen, bei denen der Promoter - zum Beispiel durch eine homologe Rekombination - vor ein endogenes B11-Gen plazierte wird, und so die Expression des B11-Proteins steuert. Analog kann auch die zu exprimierende Nukleinsäuresequenz (z.B. kodierend für ein B11-Protein) derart 30 hinter einen endogenen Promotor plazierte werden, dass der gleiche Effekt auftritt. Beide Ansätze führen zu rekombinanten Expressionskassetten im Sinne der Erfindung.

Unter einem "gewebespezifischen Promotor, der im wesentlichen 35 keine Aktivität in der Blattepidermis aufweist" sind im Rahmen dieser Erfindung allgemein solche Promotoren zu verstehen, die geeignet sind eine rekombinante Expression einer Nukleinsäuresequenz mindestens in einem pflanzlichen Gewebe zu gewährleisten oder zu erhöhen, mit der Maßgabe, dass

40

- a) besagtes pflanzliches Gewebe ausgewählt ist aus allen pflanzlichen Geweben mit Ausnahme der Blattepidermis, und

- b) die rekombinante Expression unter Kontrolle des besagten Promotors in besagtem pflanzlichen Gewebe mindestens das fünffache, bevorzugt mindestens das zehnfache, besonders bevorzugt mindestens das einhundertfache der Expression in der pflanzlichen Blattepidermis beträgt.

Dem Fachmann sind zahlreiche Promotoren bekannt, die diesen Anforderungen genügen. Insbesondere geeignet sind gewebespezifische Promotoren, wie beispielsweise, jedoch nicht einschränkend Promotoren mit Spezifitäten für die Antheren, Ovarien, Blüten, Stengel, Wurzeln, Knollen oder Samen.

- a) Als Samen spezifische Promotoren bevorzugt sind zum Beispiel die Promotoren des Phaseolins (US 5,504,200; Bustos MM et al. (1989) Plant Cell 1(9):839-53), 2S Albumins (Joseffson LG et al. (1987) J Biol Chem 262:12196-12201), Legumins (Shirsat A et al. (1989) Mol Gen Genet 215(2):326-331) und Legumin B4 (LeB4; Baumlein H et al. (1991) Mol Gen Genet 225:121-128; Baumlein H et al. (1992) Plant J 2(2):233-9; Fiedler U et al. (1995) Biotechnology (NY) 13(10):1090f), USP (unknown seed protein; Baumlein H et al. (1991) Mol Gen Genet 225(3):459-67), Napins (US 5,608,152; Stalberg K et al. (1996) L Planta 199:515-519), Saccharosebindepoteins (WO 00/26388), Oleosins (WO 98/45461), oder der Bce4-Promoter aus Brassica (WO 91/13980). Weitere geeignete samenspezifische Promotoren sind die der Gene kodierend für das "High Molecular Weight Glutenin" (HMWG), Gliadin, Verzweigungsenzym, ADP Glucose Pyrophosphatase (AGPase) oder die Stärkesynthase. Bevorzugt sind ferner Promotoren, die eine samenspezifische Expression in Monokotyledonen wie Mais, Gerste, Weizen, Roggen, Reis etc. erlauben. Vorteilhaft eingesetzt werden können der Promoter des lpt2 oder lpt1-Gen (WO 95/15389, WO 95/23230) oder die Promotoren beschrieben in WO 99/16890 (Promotoren des Hordein-Gens, des Glutelin-Gens, des Oryzin-Gens, des Prolamin-Gens, des Gliadin-Gens, des Glutelin-Gens, des Zein-Gens, des Kasirin-Gens oder des Secalin-Gens). Weitere samenspezifische Promotoren sind beschrieben in WO 89/03887.
- b) Knollen-, Speicherwurzel- oder Wurzel-spezifische Promotoren umfassen beispielsweise den Promotor des Patatin Gens (GenBank Acc.-No.: A08215), den Patatin Promotor Klasse I B33-Promotor (GenBank Acc.-No.: X14483) oder den Promotor des Cathepsin D Inhibitors aus Kartoffel. Insbesondere



bevorzugt ist der Promotor beschrieben durch SEQ ID NO: 29. Knollen-spezifische Promotoren sind im Rahmen der Erfindung insbesondere zum Erzielen einer Resistenz gegen *Phytophthora infestans* geeignet. Da obligat-biotrophe Pilze nur Blätter befallen, ist eine Aktivität im epidermalen Knollengewebe unerheblich.

- c) Blütenspezifische Promotoren umfassen beispielsweise den Phytoen Synthase Promotor (WO 92/16635) oder den Promotor des P-rr Gens (WO 98/22593).
- d) Antheren-spezifische Promotoren umfassen beispielsweise den 5126-Promotor (US 5,689,049, US 5,689,051), den glob-1 Promotor und den  $\gamma$ -Zein Promotor.
- e) Ährenspezifische Promotoren, wie beispielsweise der in US 6,291,666. Ähren-spezifische Promotoren sind insbesondere zur Vermittlung einer Resistenz gegen Fusarium vorteilhaft.
- f) Mesophyll-spezifische Promotoren wie beispielsweise der Promotor des Weizen Germin 9f-3.8 Gens (GenBank Acc.-No.: M63224) oder der Gerste Gera Promotor (WO 02/057412). Besagte Promotoren sind insbesondere vorteilhaft, da sie sowohl mesophyll-spezifisch und pathogen-induzierbar sind. Ferner geeignet ist der mesophyll-spezifische Arabidopsis CAB-2 Promotor (GenBank Acc.-No.: X15222), sowie der Zea mays PPCZm1 Promotor (GenBank Acc.-No.: X63869). Insbesondere bevorzugt sind die Promotor beschrieben durch SEQ ID NO: 30, 31 oder 32.

Die in den erfindungsgemäßen rekombinanten Expressionskassetten oder Vektoren enthaltenen Nukleinsäuresequenzen können mit weiteren genetischen Kontrollsequenzen neben einem Promoter funktionell verknüpft sein. Der Begriff der genetischen Kontrollsequenzen ist breit zu verstehen und meint all solche Sequenzen, die einen Einfluß auf das Zustandekommen oder die Funktion der erfindungsgemäßen rekombinanten Expressionskassette haben. Genetische Kontrollsequenzen umfassen auch weitere Promotoren, Promotorelemente oder Minimalpromotoren, die die expressionssteuernden Eigenschaften modifizieren können. So kann durch genetische Kontrollsequenzen zum Beispiel die gewebespezifische Expression zusätzlich abhängig von bestimmten

Stressfaktoren erfolgen. Entsprechende Elemente sind zum Beispiel für Wasserstress, Abscisisäure (Lam E & Chua NH (1991) J Biol Chem 266(26):17131-17135) und Hitzestress (Schoffl F et al. (1989) Mol Gen Genet 217(2-3):246-53) beschrieben.

5

Genetische Kontrollsequenzen umfassen ferner auch die 5'-untranslatierte Regionen, Introns oder nichtkodierende 3'-Region von Genen wie beispielsweise das Actin-1 Intron, oder die Adh1-S Introns 1, 2 und 6 (allgemein: The Maize Handbook, Chapter 116, Freeling and Walbot, Eds., Springer, New York (1994)). Es ist  
10 gezeigt worden, dass diese eine signifikante Funktionen bei der Regulation der Genexpression spielen können. So wurde gezeigt, dass 5'-untranslatierte Sequenzen die transiente Expression heterologer Gene verstärken können. Beispielfür  
15 Translationsverstärker sei die 5'-Leadersequenz aus dem Tabak-Mosaik-Virus zu nennen (Gallie et al. (1987) Nucl Acids Res 15:8693-8711) und dergleichen. Sie können ferner die Gewebsspezifität fördern (Rouster J et al. (1998) Plant J 15:435-440).

20

Die rekombinante Expressionskassette kann vorteilhafterweise eine oder mehrere sogenannte "enhancer Sequenzen" funktionell verknüpft mit dem Promoter enthalten, die eine erhöhte rekombinante Expression der Nukleinsäuresequenz ermöglichen.  
25 Auch am 3'-Ende der rekombinant zu exprimierenden Nukleinsäuresequenzen können zusätzliche vorteilhafte Sequenzen inseriert werden, wie weitere regulatorische Elemente oder Terminatoren. Die rekombinant zu exprimierenden Nukleinsäuresequenzen können in einer oder mehreren Kopien im  
30 Genkonstrukt enthalten sein.

Als Kontrollsequenzen geeignete Polyadenylierungssignale sind pflanzliche Polyadenylierungssignale, vorzugsweise solche, die im wesentlichen T-DNA Polyadenylierungssignale aus *Agrobacterium*  
35 *tumefaciens*, insbesondere der OCS (Octopin-Synthase)-Terminator und der NOS (Nopalinsynthase)-Terminator.

Als Kontrollsequenzen sind weiterhin solche zu verstehen, die eine homologe Rekombination bzw. Insertion in das Genom eines  
40 Wirtsorganismus ermöglichen oder die Entfernung aus dem Genom erlauben. Bei der homologen Rekombination kann zum Beispiel der natürliche Promoter eines B11-Gens gegen einen der bevorzugten gewebespezifischen Promoter ausgetauscht werden. Methoden wie die cre/lox-Technologie erlauben eine gewebespezifische, unter

Umständen induzierbare Entfernung der rekombinanten Expressionskassette aus dem Genom des Wirtsorganismus (Sauer B (1998) Methods. 14(4):381-92). Hier werden bestimmte flankierende Sequenzen dem Zielgen angefügt (lox-Sequenzen), die  
5 später eine Entfernung mittels der cre-Rekombinase ermöglichen.

Eine rekombinante Expressionskassetten und die von ihr abgeleiteten Vektoren können weitere Funktionselemente enthalten. Der Begriff Funktionselement ist breit zu verstehen  
10 und meint all solche Elemente, die einen Einfluß auf Herstellung, Vermehrung oder Funktion der erfindungsgemäßen rekombinanten Expressionskassetten, Vektoren oder rekombinanten Organismen haben. Beispielphaft aber nicht einschränkend seien zu nennen:

- 15 a) Selektionsmarker, die eine Resistenz gegen einen Metabolismusinhibitor wie 2-Desoxyglucose-6-phosphat (WO 98/45456), Antibiotika oder Biozide, bevorzugt Herbizide, wie zum Beispiel Kanamycin, G 418, Bleomycin,  
20 Hygromycin, oder Phosphinotricin etc. verleihen. Besonders bevorzugte Selektionsmarker sind solche die eine Resistenz gegen Herbizide verleihen. Beispielphaft seien genannt: DNA Sequenzen, die für Phosphinothricinacetyltransferasen (PAT) kodieren und Glutaminsynthaseinhibitoren inaktivieren (bar und pat Gen), 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphatsynthasegene (EPSP Synthasegene), die eine Resistenz gegen Glyphosat® (N-(phosphonomethyl)glycin) verleihen, das für das Glyphosat®  
25 degradierende Enzyme kodierende gox Gen (Glyphosatoxidoreduktase), das deh Gen (kodierend für eine Dehalogenase, die Dalapon® inaktiviert), Sulfonylhurea- und Imidazolinon inaktivierende Acetolactatsynthasen sowie bxn Gene, die für Bromoxynil degradierende Nitrilaseenzyme kodieren, das aasa-Gen, das eine Resistenz gegen das Antibiotikum Apectinomycin verleiht, das  
30 Streptomycinphosphotransferase (SPT) Gen, das eine Resistenz gegen Streptomycin gewährt, das Neomycinphosphotransferase (NPTII) Gen, das eine Resistenz gegen Kanamycin oder Geneticidin verleiht, das Hygromycinphosphotransferase (HPT) Gen, das eine Resistenz gegen Hygromycin vermittelt, das  
40 Acetolactatsynthase Gen (ALS), das eine Resistenz gegen Sulfonylharnstoff-Herbizide verleiht (z.B. mutierte ALS-Varianten mit z.B. der S4 und/oder Hra Mutation).

- b) Reportergene, die für leicht quantifizierbare Proteine kodieren und über Eigenfarbe oder Enzymaktivität eine Bewertung der Transformationseffizienz oder des Expressionsortes oder -zeitpunktes gewährleisten. Ganz besonders bevorzugt sind dabei Reporter-Proteine (Schenborn E, Groskreutz D. Mol Biotechnol. 1999; 13(1):29-44) wie das "green fluorescence protein" (GFP) (Sheen et al. (1995) Plant Journal 8(5):777-784; Haseloff et al. (1997) Proc Natl Acad Sci USA 94(6):2122-2127; Reichel et al. (1996) Proc Natl Acad Sci USA 93(12):5888-5893; Tian et al. (1997) Plant Cell Rep 16:267-271; WO 97/41228; Chui WL et al. (1996) Curr Biol 6:325-330; Leffel SM et al. (1997) Biotechniques. 23(5):912-8), die Chloramphenicoltransferase, eine Luziferase (Ow et al. (1986) Science 234:856-859; Millar et al. (1992) Plant Mol Biol Rep 10:324-414), das Aequorin (Prasher et al. (1985) Biochem Biophys Res Commun 126(3):1259-1268), die  $\beta$ -Galactosidase, R-Locus Gen (kodieren ein Protein, das die Produktion von Anthocyaninpigmenten (rote Färbung) in pflanzlichen Gewebe reguliert und so eine direkte Analyse der Promotoraktivität ohne Zugabe zusätzlicher Hilfstoffe oder chromogener Substrate ermöglicht; Dellaporta et al., In: Chromosome Structure and Function: Impact of New Concepts, 18th Stadler Genetics Symposium, 11:263-282, 1988), ganz besonders bevorzugt ist die  $\beta$ -Glucuronidase (Jefferson et al., EMBO J. 1987, 6, 3901-3907).
- c) Replikationsursprünge, die eine Vermehrung der erfindungsgemäßen rekombinanten Expressionskassetten oder Vektoren in zum Beispiel E.coli gewährleisten. Beispielsweise seien genannt ORI (origin of DNA replication), der pBR322 ori oder der P15A ori (Sambrook et al.: Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989).
- d) Elemente, die für eine Agrobakterium vermittelte Pflanzentransformation erforderlich sind, wie zum Beispiel die rechte oder linke Begrenzung der T-DNA oder die vir-Region.
- Zur Selektion erfolgreich homolog rekombinierter oder auch transformierter Zellen ist es in der Regel erforderlich, einen selektionierbaren Marker zusätzlich einzuführen, der den erfolgreich rekombinierten Zellen eine Resistenz gegen ein Biozid (zum Beispiel ein Herbizid), einen Metabolismusinhibitor

wie 2-Desoxyglucose-6-phosphat (WO 98/45456) oder ein Antibiotikum verleiht. Der Selektionsmarker erlaubt die Selektion der transformierten Zellen von untransformierten (McCormick et al. (1986) Plant Cell Reports 5:81-84).

5

Die Einführung einer erfindungsgemäßen rekombinanten Expressionskassette in einen Organismus oder Zellen, Geweben, Organe, Teile bzw. Samen desselben (bevorzugt in Pflanzen bzw. pflanzliche Zellen, Gewebe, Organe, Teile oder Samen), kann vorteilhaft unter Verwendung von Vektoren realisiert werden, in denen die rekombinanten Expressionskassetten enthalten sind. Die rekombinante Expressionskassette kann in den Vektor (zum Beispiel ein Plasmid) über eine geeignete Restriktionsschnittstelle eingeführt werden. Das entstandene Plasmid wird zunächst in E.coli eingeführt. Korrekt transformierte E.coli werden selektioniert, gezüchtet und das rekombinante Plasmid mit dem Fachmann geläufigen Methoden gewonnen. Restriktionsanalyse und Sequenzierung können dazu dienen, den Klonierungsschritt zu überprüfen.

20

Vektoren können beispielhaft Plasmide, Cosmide, Phagen, Viren oder auch Agrobakterien sein. In einer vorteilhaften Ausführungsform wird die Einführung der rekombinanten Expressionskassette mittels Plasmidvektoren realisiert.

Bevorzugt sind solche Vektoren, die eine stabile Integration der rekombinanten Expressionskassette in das Wirtsgenom ermöglichen.

Die Herstellung eines transformierten Organismus (bzw. einer transformierten Zelle oder Gewebes) erfordert, dass die entsprechende DNA, RNA oder Protein in die entsprechende Wirtszelle eingebracht wird.

30

Für diesen Vorgang, der als Transformation (oder Transduktion bzw. Transfektion) bezeichnet wird, steht eine Vielzahl von Methoden zur Verfügung (Keown et al. (1990) Methods Enzymol 185:527-537; Jenes B et al. (1993) Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von SD Kung und R Wu, Academic Press, S. 128-143 sowie in Potrykus (1991) Annu Rev Plant Physiol Plant Molec Biol 42:205-225).

40

So kann die DNA oder RNA beispielhaft direkt durch Mikroinjektion oder durch Bombardierung mit DNA-beschichteten Mikropartikeln eingeführt werden. Auch kann die Zelle chemisch,

- zum Beispiel mit Polyethylenglykol, permeabilisiert werden, so dass die DNA durch Diffusion in die Zelle gelangen kann. Die DNA kann auch durch Protoplastenfusion mit anderen DNA-enthaltenden Einheiten wie Minicells, Zellen, Lysosomen oder Liposomen
- 5 erfolgen. Elektroporation ist eine weitere geeignete Methode zur Einführung von DNA, bei der die Zellen reversibel durch einen elektrischen Impuls permeabilisiert werden. Entsprechende Verfahren sind beschrieben (beispielsweise bei Bilang et al. (1991) Gene 100:247-250; Scheid et al. (1991) Mol Gen Genet
- 10 228:104-112; Guerche et al. (1987) Plant Science 52:111-116; Neuhaus et al. (1987) Theor Appl Genet 75:30-36; Klein et al. (1987) Nature 327:70-73 ; Howell et al. (1980) Science 208:1265; Horsch et al. (1985) Science 227:1229-1231 ; DeBlock et al. (1989) Plant Physiol 91:694-701).
- 15 Bei Pflanzen werden dabei die beschriebenen Methoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengewebe oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen Transformation genutzt. Geeignete Methoden sind vor allem die
- 20 Protoplastentransformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, das biolistische Verfahren mit der Genkanone, die sogenannte "particle bombardment" Methode, die Elektroporation, die Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung und die Mikroinjektion.
- 25 Neben diesen "direkten" Transformationstechniken kann eine Transformation auch durch bakterielle Infektion mittels *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes* durchgeführt werden. Die *Agrobacterium*-vermittelte
- 30 Transformation ist am besten für dicotyledone Pflanzenzellen geeignet. Die Verfahren sind beispielsweise beschrieben bei Horsch et al. (1985) Science 225: 1229f).
- 35 Werden *Agrobacterien* verwendet, so ist die rekombinante Expressionskassette in spezielle Plasmide zu integrieren, entweder in einen Zwischenvektor (englisch: shuttle or intermediate vector) oder einen binären Vektor. Wird ein Ti oder Ri Plasmid zur Transformation verwendet werden soll, ist
- 40 zumindest die rechte Begrenzung, meistens jedoch die rechte und die linke Begrenzung der Ti oder Ri Plasmid T-DNA als flankierende Region mit der einzuführenden rekombinanten Expressionskassette verbunden.

Bevorzugt werden binäre Vektoren verwendet. Binäre Vektoren können sowohl in *E.coli* als auch in *Agrobacterium* replizieren. Sie enthalten in der Regel ein Selektionsmarkergen und einen Linker oder Polylinker flankiert von der rechten und linken T-DNA Begrenzungssequenz. Sie können direkt in *Agrobacterium* transformiert werden (Holsters et al. (1978) Mol Gen Genet 163:181-187). Das Selektionsmarkergen erlaubt eine Selektion transformierter *Agrobacteria* und ist zum Beispiel das *nptII* Gen, das eine Resistenz gegen Kanamycin verleiht. Das in diesem Fall als Wirtsorganismus fungierende *Agrobacterium* sollte bereits ein Plasmid mit der *vir*-Region enthalten. Diese ist für die Übertragung der T-DNA auf die pflanzliche Zelle erforderlich. Ein so transformiertes *Agrobacterium* kann zur Transformation pflanzlicher Zellen verwendet werden. Die Verwendung von T-DNA zur Transformation pflanzlicher Zellen ist intensiv untersucht und beschrieben (EP 120 516; Hoekema, In: The Binary Plant Vector System, Offsetdrukkerij Kanters B.V., Alblisserdam, Chapter V; An et al. (1985) EMBO J 4:277-287). Verschiedene binäre Vektoren sind bekannt und teilweise kommerziell erhältlich wie zum Beispiel pBI101.2 oder pBIN19 (Bevan et al. (1984) Nucl Acids Res 12:8711f; Clontech Laboratories, Inc. USA). Weitere zur Expression in Pflanzen geeignete Promotoren sind beschrieben (Rogers et al. (1987) Methods Enzymol 153:253-277; Schardl et al. (1987) Gene 61:1-11; Berger et al. (1989) Proc Natl Acad Sci USA 86:8402-8406).

Direkte Transformationstechniken eignen sich im Prinzip für jeden Organismus und Zelltyp. Im Falle von Injektion oder Elektroporation von DNA bzw. RNA in pflanzliche Zellen sind keine besonderen Anforderungen an das verwendete Plasmid gestellt. Einfache Plasmide wie die der pUC-Reihe können verwendet werden. Sollen vollständige Pflanzen aus den transformierten Zellen regeneriert werden, so ist es erforderlich, dass sich auf dem Plasmid ein zusätzliches selektionierbares Markergen befindet.

Stabil transformierte Zellen d.h. solche, die die eingeführte DNA integriert in die DNA der Wirtszelle enthalten, können von untransformierten selektioniert werden, wenn ein selektionierbarer Marker Bestandteil der eingeführten DNA ist. Als Marker kann beispielhaft jedes Gen fungieren, das eine Resistenz gegen Antibiotika oder Herbizide (wie Kanamycin, G 418, Bleomycin, Hygromycin oder Phosphinotricin etc.) zu verleihen vermag (s.o.). Transformierte Zellen, die ein solches

Markergergen exprimieren, sind in der Lage, in der Gegenwart von Konzentrationen eines entsprechenden Antibiotikums oder Herbizides zu überleben, die einen untransformierten Wildtyp abtöten. Beispiel für geeignete Selektionsmarker sind oben

5 genannt. Sobald eine transformierte Pflanzenzelle hergestellt wurde, kann eine vollständige Pflanze unter Verwendung von dem Fachmann bekannten Verfahren erhalten werden. Hierbei geht man beispielhaft von Kalluskulturen aus. Aus diesen noch

10 undifferenzierten Zellmassen kann die Bildung von Sproß und Wurzel in bekannter Weise induziert werden. Die erhaltenen Sprößlinge können ausgepflanzt und gezüchtet werden. Dem Fachmann sind Verfahren bekannt, um aus Pflanzenzellen, Pflanzenteile und ganze Pflanzen zu regenerieren. Beispielsweise werden hierzu Verfahren beschrieben von Fennell et al. (1992)

15 Plant Cell Rep. 11: 567-570; Stoeger et al (1995) Plant Cell Rep. 14:273-278; Jahne et al. (1994) Theor Appl Genet 89:525-533 verwendet. Die erhaltenen Pflanzen können in der üblichen Weise gezüchtet und/oder gekreuzt werden. Zwei oder mehr Generationen sollten kultiviert werden, um sicherzustellen, dass die

20 genomische Integration stabil und vererblich ist.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann vorteilhaft mit weiteren Verfahren die eine Pathogenresistenz (beispielsweise gegen Insekten, Pilze, Bakterien, Nematoden etc.), Streßresistenz oder

25 eine andere Verbesserung der pflanzlichen Eigenschaften bewirken kombiniert werden. Beispiele sind u.a. genannt bei Dunwell JM (2000) J Exp Bot. 51 Spec No:487-96.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft

30 Polypeptidsequenzen kodierend für B11 Protein umfassend mindestens eine Sequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus

- a) den Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 28, 30, 32 oder 38,
- 35 b) Sequenzen die eine Homologie von mindestens 90%, bevorzugt mindestens 95%, besonders bevorzugt mindesten 98% zu einer der Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 28, 30, 32 oder 38 aufweisen, und
- 40 c) Sequenzen die mindestens 10, bevorzugt mindestens 20, besonders bevorzugt mindestens 30 zusammenhängende Aminosäuren einer der Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 28, 30, 32 oder 38 umfassen.



- Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft Nukleinsäuresequenzen kodierend für die erfindungsgemäßen neuen Polypeptidsequenzen kodierend für BI1-Proteine. Bevorzugt sind
- 5 die Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31 oder 37, die dazu komplementäre Nukleinsäuresequenz und die durch Entartung (Degeneration) des genetischen Codes abgeleitete Sequenzen.
- 10 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft rekombinante Expressionskassetten, die eine der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen umfassen. In den erfindungsgemäßen rekombinanten Expressionskassetten ist die Nukleinsäuresequenz kodierend für das BI1-Protein aus Gerste mit mindestens einem
- 15 genetischen Kontrollelement nach obiger Definition derart verknüpft, das die Expression (Transkription und ggf. Translation) in einem beliebigen Organismus - bevorzugt in Pflanzen - realisiert werden kann. Dazu geeignete genetische Kontrollelemente sind oben beschrieben. Die rekombinanten
- 20 Expressionskassetten können auch weitere Funktionselementen gemäß obiger Definition enthalten. Die insertierte Nukleinsäuresequenz kodierend für ein BI1-Protein aus Gerste kann in sense- oder antisense-Orientierung in die Expressionskassette insertiert sein, und damit zu Expression
- 25 von sense- oder antisense-RNA führen. Erfindungsgemäß sind auch rekombinante Vektoren, die die rekombinanten Expressionskassetten beinhalten.
- "Rekombinant" meint bezüglich zum Beispiel einer
- 30 Nukleinsäuresequenz, einer Expressionskassette oder einem Vektor enthaltend besagte Nukleinsäuresequenz oder einem Organismus transformiert mit besagter Nukleinsäuresequenz, Expressionskassette oder Vektor alle solche durch gentechnische Methoden zustandegekommene Konstruktionen, in denen sich
- 35 entweder
- a) die BI1 Nukleinsäuresequenz, oder
  - b) eine mit der BI1 Nukleinsäuresequenz funktionell verknüpfte
  - 40 genetische Kontrollsequenz, zum Beispiel ein Promotor, oder
  - c) (a) und (b)

sich nicht in ihrer natürlichen, genetischen Umgebung befinden oder durch gentechnische Methoden modifiziert wurden, wobei die Modifikation beispielhaft eine Substitutionen, Additionen, Deletionen, Inversion oder Insertionen eines oder mehrerer

5 Nukleotidreste sein kann. Natürliche genetische Umgebung meint den natürlichen chromosomalen Locus in dem Herkunftsorganismus oder das Vorliegen in einer genomischen Bibliothek. Im Fall einer genomischen Bibliothek ist die natürliche, genetische Umgebung der Nukleinsäuresequenz bevorzugt zumindest noch

10 teilweise erhalten. Die Umgebung flankiert die Nukleinsäuresequenz zumindest an einer Seite und hat eine Sequenzlänge von mindestens 50 bp, bevorzugt mindestens 500 bp, besonders bevorzugt mindestens 1000 bp, ganz besonders bevorzugt mindestens 5000 bp. Eine natürlich vorkommende

15 Expressionskassette - beispielsweise die natürlich vorkommende Kombination des B11-Promotors mit dem entsprechenden B11-Gen - wird zu einer rekombinanten Expressionskassette, wenn diese durch nicht-natürliche, synthetische ("künstliche") Verfahren wie beispielsweise einer Mutagenisierung geändert wird.

20 Entsprechende Verfahren sind beschrieben (US 5,565,350; WO 00/15815; siehe auch oben).

Ein anderer Gegenstand der Erfindung betrifft rekombinante Organismen, transformiert mit wenigstens einer erfindungsgemäßen

25 Nukleinsäuresequenzen, Expressionskassette oder einem erfindungsgemäßen Vektor, sowie Zellen, Zellkulturen, Gewebe, Teile - wie zum Beispiel bei pflanzlichen Organismen Blätter, Wurzeln usw.- oder Vermehrungsgut abgeleitet von solchen Organismen. Organismus ist breit zu verstehen und meint

30 prokaryotische und eukaryotische Organismen, bevorzugt Bakterien, Hefen, Pilze, tierische und pflanzliche Organismen. Als rekombinante Organismen bevorzugte Wirts- oder Ausgangsorganismen sind vor allem Pflanzen gemäß der oben genannten Definition.

35 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung der erfindungsgemäßen, rekombinanten Organismen und der von ihnen abgeleitete Zellen, Zellkulturen, Teile - wie zum Beispiel bei rekombinanten pflanzlichen Organismen Wurzeln, Blätter etc.-

40 , und rekombinantes Vermehrungsgut wie Saaten oder Früchte, zur Herstellung von Nahrungs- oder Futtermitteln, Pharmazeutika oder Feinchemikalien.

Weiterhin wird ein Nukleinsäuremolekül, das antisense zu der erfindungsgemäßen Nukleinsäure ist, ein monoclonaler, spezifisch an das erfindungsgemäße Polypeptide bindender Antikörper und ein Fungizid, das die erfindungsgemäße Nukleinsäure, den erfindungsgemäßen Vektor, insbesondere einen infektiösen, z.B. viralen erfindungsgemäßen Vektor, das erfindungsgemäße Polypeptide in einer zur Auftragung auf Pflanzen geeigneten Form enthält, z.B. verkapselt oder in einem infektiösen, vorzugsweise zur Übertragung von Nukleinsäuren oder Expression von Genen in einer Zelle geeigneten Organismus, wie ein Agrobacterium oder ein Virus.

In einer Ausführungsform betrifft die Erfindung die Verwendung eines BI-1 codierenden Nukleinsäuremoleküls oder eines BI-1 Proteins zur Herstellung einer Pathogen-resistenten Pflanze, vorzugsweise zur Herstellung einer gegen Pilze resistenten Pflanze oder zur Herstellung eines dies bewirkenden Fungizids oder zur Bekämpfung oder Behandlung von mit Pathogenen befallenen oder durch Pathogene bedrohten Pflanzen.

Sequenzen

1. SEQ ID NO: 1 : Nukleinsäuresequenz kodierend für ein BI1 Protein aus Gerste (*Hordeum vulgare*).
2. SEQ ID NO: 2 : Aminosäuresequenz kodierend für ein BI1 Protein aus Gerste (*Hordeum vulgare*).
3. SEQ ID NO: 3 : Nukleinsäuresequenz kodierend für ein BI1 Protein aus *Arabidopsis thaliana*.
4. SEQ ID NO: 4 : Aminosäuresequenz kodierend für ein BI1 Protein aus *Arabidopsis thaliana*.
5. SEQ ID NO: 5 : Nukleinsäuresequenz kodierend für ein BI1 Protein aus Tabak.
6. SEQ ID NO: 6 : Aminosäuresequenz kodierend für ein BI1 Protein aus Tabak.
7. SEQ ID NO: 7 : Nukleinsäuresequenz kodierend für ein BI1 Protein aus Reis.

8. SEQ ID NO: 8: Aminosäuresequenz kodierend für ein BI1 Protein aus Reis.
- 5 9. SEQ ID NO: 9 : Nukleinsäuresequenz kodierend für ein BI1 Protein aus Raps.
10. SEQ ID NO: 10 : Aminosäuresequenz kodierend für ein BI1 Protein aus Raps.
- 10 11. SEQ ID NO: 11 : Nukleinsäuresequenz kodierend für Teil eines BI1 Protein aus Soja.
12. SEQ ID NO: 12: Aminosäuresequenz kodierend für Teil eines BI1 Protein aus Soja.
- 15 13. SEQ ID NO: 13 : Nukleinsäuresequenz kodierend für Teil eines BI1 Protein aus Soja.
14. SEQ ID NO: 14: Aminosäuresequenz kodierend für Teil eines BI1 Protein aus Soja.
- 20 15. SEQ ID NO: 15 : Nukleinsäuresequenz kodierend für Teil eines BI1 Protein aus Weizen.
- 25 16. SEQ ID NO: 16 : Aminosäuresequenz kodierend für Teil eines BI1 Protein aus Weizen.
17. SEQ ID NO: 17 : Nukleinsäuresequenz kodierend für Teil eines BI1 Protein aus Mais.
- 30 18. SEQ ID NO: 18 : Aminosäuresequenz kodierend für Teil eines BI1 Protein aus Mais.
19. SEQ ID NO: 19 : Nukleinsäuresequenz kodierend für Teil eines BI1 Protein aus Weizen.
- 35 20. SEQ ID NO: 20 : Aminosäuresequenz kodierend für Teil eines BI1 Protein aus Weizen.
- 40 21. SEQ ID NO: 21 : Nukleinsäuresequenz kodierend für Teil eines BI1 Protein aus Mais.
22. SEQ ID NO: 22 : Aminosäuresequenz kodierend für Teil eines BI1 Protein aus Mais.

23. SEQ ID NO: 23 : Nukleinsäuresequenz kodierend für Teil  
eines BI1 Protein aus Mais.
- 5 24. SEQ ID NO: 24 : Aminosäuresequenz kodierend für Teil  
eines BI1 Protein aus Mais.
25. SEQ ID NO: 25 : Nukleinsäuresequenz kodierend für Teil  
eines BI1 Protein aus Weizen.
- 10 26. SEQ ID NO: 26 : Aminosäuresequenz kodierend für Teil  
eines BI1 Protein aus Weizen.
- 15 27. SEQ ID NO: 27 : Nukleinsäuresequenz kodierend für Teil  
eines BI1 Protein aus Mais.
28. SEQ ID NO: 28 : Aminosäuresequenz kodierend für Teil  
eines BI1 Protein aus Mais.
- 20 29. SEQ ID NO: 29 : Nukleinsäuresequenz kodierend für den  
Patatin Promotor aus Kartoffel.
30. SEQ ID NO: 30 : Nukleinsäuresequenz kodierend für den  
Germin 9f-3.8 Promotor aus Weizen.
- 25 31. SEQ ID NO: 31 : Nukleinsäuresequenz kodierend für den  
Arabidopsis CAB-2 Promotor
- 30 32. SEQ ID NO: 32 : Nukleinsäuresequenz kodierend für den  
PPCZm1 Promotor aus Mais
33. SEQ ID NO: 33 : Nukleinsäuresequenz kodierend für  
rekombinanten Expressionsvektor pÜbiBI-1
- 35 34. SEQ ID NO: 34 : Nukleinsäuresequenz kodierend für  
rekombinanten Expressionsvektor  
pLol14ÜbiBI-1
- 40 35. SEQ ID NO: 35 : Nukleinsäuresequenz kodierend für  
rekombinanten Expressionsvektor pOXoBI-1
36. SEQ ID NO: 36 : Nukleinsäuresequenz kodierend für  
rekombinanten Expressionsvektor  
pLol14OXoBI-1

37. SEQ ID NO: 37: Nukleinsäuresequenz kodierend für BI-1 Protein aus Weizen
- 5 38. SEQ ID NO: 38: Aminosäuresequenz kodierend für BI-1 Protein aus Weizen
39. SEQ ID NO: 39: Nukleinsäuresequenz für PEN1 (= ROR2) aus Gerste
- 10 40. SEQ ID NO: 40: Aminosäuresequenz kodierend für PEN1 (= ROR2) aus Gerste
41. SEQ ID NO: 41: Nukleinsäuresequenz für PEN1 (= ROR2) aus Arabidopsis thaliana
- 15 42. SEQ ID NO: 42: Aminosäuresequenz kodierend für PEN1 (= ROR2) aus Arabidopsis thaliana
- 20 43. SEQ ID NO: 43: Nukleinsäuresequenz kodierend für SNAP34 aus Gerste
44. SEQ ID NO: 44: Aminosäuresequenz kodierend für SNAP34 aus Gerste

25  
Abbildungen

1. Fig. 1a-d: Vergleich von Proteinsequenzen verschiedener BI-1 Proteine aus Pflanzen. AtBI-1: Arabidopsis; BnBI-1: Brassica napus (Raps); GmBI2: Glycine max (Soja; Variante 1); GmBI3: Glycine max (Soja; Variante 2); HvBI-1: Hordeum vulgare (Gerste); NtBI-1: Nicotiana tabacum (Tabak); OsBI-1: Oryza sativa (Reis); TaBI11: Triticum aestivum (Weizen, Variante 1); TaBI18: Triticum aestivum (Weizen, Variante 2); TaBI5 neu: Triticum aestivum (Weizen, Variante 3); ZmBI14: Zea mays (Mais; Variante 1); ZmBI16: Zea mays (Mais; Variante 2); ZmBI33: Zea mays (Mais; Variante 3); ZmBI8: Zea mays (Mais; Variante 4); Consensus: Aus dem Alignment abgeleitete Konsensussequenz.
- 30
- 35
- 40
2. Fig. 2: Vektorkarte für Vektor pUbiBI-1 (Ubi: Ubiquitin-Promotor; BI-1 Nukleinsäuresequenz kodierend für Gerste BI1-Protein; ter: Transkriptionsterminator). Angegeben sind

ferner die Lokalisation der Schnittstellen verschiedener Restriktionsenzyme.

3. Fig. 3: Vektorkarte für Vektor pLO114UbiBI-1 (Ubi: Ubiquitin-Promotor; BI-1 Nukleinsäuresequenz kodierend für Gerste B11-Protein; ter: Transkriptionsterminator).  
5 Angegeben sind ferner die Lokalisation der Schnittstellen verschiedener Restriktionsenzyme.
4. Fig. 4: Vektorkarte für Vektor pOxoBI-1 (Oxo: TaGermin 9f-2.8 Promotor; BI-1 Nukleinsäuresequenz kodierend für Gerste B11-Protein; ter: Transkriptionsterminator). Angegeben sind  
10 ferner die Lokalisation der Schnittstellen verschiedener Restriktionsenzyme.
5. Fig. 5: Vektorkarte für Vektor pLO114OxoBI-1 (Oxo: TaGermin 9f-2.8 Promotor; BI-1 Nukleinsäuresequenz kodierend für Gerste B11-Protein; ter: Transkriptionsterminator).  
15 Angegeben sind ferner die Lokalisation der Schnittstellen verschiedener Restriktionsenzyme.
6. Fig. 6: Vergleich der Proteinssequenzen von BI-1 Proteinen aus Gerste (*Hordeum vulgare*, GenBank Acc.-No.: CAC37797),  
20 Reis (*Oryza sativa*, GenBank-Acc.-No.: Q9MBD8), *Arabidopsis thaliana* (GenBank Acc.-No.: Q9LD45) und Mensch (*Homo sapiens*, GenBank Acc.-No.: AAB87479). Schwarzhinterlegte Aminosäuren sind identisch in allen Arten. Grau hinterlegte Aminosäuren sind nur in Pflanzen identisch. Balken zeigen die vorausgesagten sieben Transmembrandomänen in HvBI-1 an.  
25
7. Fig. 7: BI-1 Expression in resistenten und suszeptiblen Gersten-Linien (cDNA Gelblot-Analyse): cDNAs wurde mittels RT-PCR ausgehend von Gesamt-RNA synthetisiert. Gesamt-RNA wurde aus suszeptibler Gersten-Linie Pallas, resistenter Gersten-Linie BCPM1a12 und resistenter Gersten-Linie BCPm1o5  
30 zum Zeitpunkt 0 (d.h. unmittelbar vor Inokkulation), sowie jeweils 1, 4 und 7 Tage nach Inokkulation mit *Bgh* und parallel dazu aus nicht-infizierten Kontrollpflanzen (Ø) gewonnen. Die RT-PCR für BI-1 wurde unter Verwendung von 20  
35 Zyklen ausgeführt (s.u.). Die eingesetzte RNA-Menge (0.5 µg) wurde zusätzlich durch rRNA-Färbung mit Ethidiumbromid in Gelen kontrolliert. Wiederholung der Experimente ergab vergleichbare Resultate.  
40

8. Fig. 8: *BI-1* wird im Mesophyllgewebe exprimiert (cDNA Gelblot-Analyse). RT-PCR wurde ausgehend von RNA isoliert aus Pallas (P) und *BCPmla12* (P10) (24 h nach Inokulation mit *BghA6*) durchgeführt. Für die Extraktion der Gesamt-RNA wurden abaxiale epidermale Streifen (E, inokulierte Positionen der Blätter) vom Mesophyll und der adaxialen Epidermis (M) separiert. *Ubiquitin 1* (*Ubi*) wurde als Marker eine gewebeunspezifischen Genexpression verwendet. RT-PCR wurde unter Verwendung von 30 Zyklen durchgeführt.

9. Fig. 9: *BI-1* Expression wird während chemischer Resistenzinduktion reprimiert.

(A) Chemisch induzierte Resistenz in der Gersten-Linie Pallas gg. *Blumeria graminis* (DC) Speer f.sp. hordei (*Bgh*). Gersten Primärblätter wurden mit 2,6-Dichloroisonicotinsäure (DCINA) behandelt und zeigten weniger Mehltau-Pustulen als entsprechende unbehandelte Kontrollpflanzen.

(B) RNA und cDNA Blots. RNA (10 µg) wurde 0, 1, 2 und 3 Tage nach Bodenbehandlung (soil drench treatment; dpt) mit DCINA bzw. der Kontrolle (Trägersubstanz) und zusätzlich 1 und 4 Tage nach Inokulation (dpi, entspricht 4 bzw. 7 dpt) analysiert. RT-PCR (*Ubi*, *BI-1*) wurde unter Verwendung von 20 Zyklen realisiert. Wiederholung führte zu vergleichbaren Ergebnissen (siehe Beispiel 2).

Als Kontrolle wurde BCI-4 eingesetzt. BCI-4 ist ein DCINA-induziertes Gen (Besser et al. (2000) Mol Plant Pathol. 1(5): 277-286) und ein Mitglied der Barley Chemically (=BTH) Induced- Genfamilie.

10. Fig. 10: Überexpression von *BI-1* induziert Super-suszeptibilität.

(A) Durchschnittliche Penetrationseffizienz von *Bgh* in 6 unabhängigen Experimenten mit *Bgh* auf Gersten-Linie Ingrid. PE von *Bgh* war signifikant ( $p < 0.01$ , Students t-Test) erhöht in Zellen, die mit *pBI-1* transformiert (bombardiert) wurden im Vergleich zu Zellen, die mit der Leervektor-Kontrolle (*pGY1*) bombardiert wurden.

(B) Die Penetrationseffizienz von *Bgh* auf Zellen die mit einem antisense-*BI-1* Konstrukt (*pasBI-1*) bombardiert wurden,



war nicht-signifikant ( $p > 0.05$ ) vermindert im Vergleich zu Zellen, die mit der Leervektor-Kontrolle (pGY1). bombardiert wurden.

- 5 Die Säulen geben jeweils den Mittelwert der einzelnen Experimente wieder. Die Balken stellen den Standardfehler dar.
11. Fig. 11: Überexpression von *BI-1* induziert Bruch der  
10 *mlo5*-vermittelten Penetrationsresistenz.  
Penetrationseffizienz von *Bgh* wurde in 3 bis 4 unabhängigen Experimenten mit *Bgh* auf den Gersten Linien Ingrid-*mlo5* bzw. Pallas-*mlo5* bewertet. PE durch *Bgh* war signifikant ( $p < 0.05$ ) erhöht in Zellen, die mit *pBI-1* transformiert (bombardiert)  
15 wurden im Vergleich zu Zellen, die mit der Leervektor-Kontrolle (pGY1). bombardiert wurden. Die Säulen geben jeweils den Mittelwert von drei unabhängigen Experimente wieder. Die Balken stellen den Standardfehler dar.
- 20 12. Fig. 12: *BI-1* Expression wird durch toxische Kulturfiltrate aus *Bipolaris sorokiniana* induziert.  
Northern-Blots (10 µg Gesamt-RNA) mit RNA aus Ingrid (I) und BCIngrid-*mlo5* (I22). RNA wurde 0, 24, 48 und 72 h nach  
25 Injektion der toxischen Kulturfiltrate von *Bipolaris sorokiniana* (T) bzw. Wasser (W) isoliert. *BI-1* mRNAs wurde auf Nylonmembranen nach stringenten Waschen detektiert. *BI-1*: Detektion von BAX Inhibitor 1 mRNA; *Ubi*: Detektion von Ubiquitin 1; *Asprot*: Detection der Aspartatprotease mRNA; hat: Stunden nach Behandlung ("h after treatment")
- 30 13. Fig. 13: *BI-1* Überexpression bricht Nicht-Wirtsresistenz von Gerste (cv. Manchuria) gegen *Blumeria graminis* f.sp. *tritici*. Penetrationsraten wurden in drei unabhängigen Experimenten untersucht.

## Beispiele

## Allgemeine Methoden:

- 5 Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoramiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, Seite 896-897) erfolgen. Die im Rahmen der vorliegenden Erfindung durchgeführten Klonierungsschritte wie z.B. Restriktionsspaltungen,
- 10 Agarosegelelektrophorese, Reinigung von DNA-Fragmenten, Transfer von Nukleinsäuren auf Nitrozellulose und Nylonmembranen, Verknüpfen von DNA-Fragmenten, Transformation von *E. coli* Zellen, Anzucht von Bakterien, Vermehrung von Phagen und Sequenzanalyse rekombinanter DNA werden wie bei Sambrook et al.
- 15 (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press; ISBN 0-87969-309-6 beschrieben durchgeführt. Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgt mit einem Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzierer der Firma MWG-Licor nach der Methode von Sanger (Sanger et al. (1977) Proc Natl Acad Sci USA 74:5463-5467).

20

## Beispiel 1: Pflanzen, Pathogene und Inokulation

- Die Gerstensorten Ingrid, Pallas und die rückgekreuzte Linie BCPM1a12, BCPm1o5 und BCIngrid-m1o5 (I22) wurde von Lisa Munk,
- 25 Department of Plant Pathology, Royal Veterinary and Agricultural University, Kopenhagen, Dänemark zur Verfügung gestellt. Ihre Herstellung ist beschrieben (Kølster P et al. (1986) Crop Sci 26: 903-907).
- 30 Das 12 bis 36 h im Dunkeln auf feuchtem Filterpapier vorgekeimte Saatgut wurde, wenn nicht anders beschrieben, zu je 5 Körnern an den Rand eines Vierkanttopfes (8x8cm) in Fruhstorfer Erde vom Typ P ausgelegt, mit Erde bedeckt und regelmäßig mit Leitungswasser gegossen. Alle Pflanzen wurden in Klimaschränken
- 35 oder -kammern bei 18°C und 60 % relativer Luftfeuchte und einem 16-stündigen Licht / 8-stündigen Dunkelheitszyklus mit 3000 bzw. 5000 lux (50 bzw. 60  $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$  Photonenflussdichte) 5 bis 8 Tage lang kultiviert und im Keimlingsstadium in den Versuchen verwendet. Bei Experimenten, in denen Applikationen an
- 40 Primärblättern durchgeführt wurden, waren diese vollständig entwickelt.

Vor Durchführung der transienten Transfektionsexperimente wurden die Pflanzen in Klimaschränken oder -kammern bei tagsüber 24°C,

Verminderung der *B11* Expression 1 bis 3 Tage nach chemischer Behandlung (Fig. 9B).

### Beispiel 3: RNA-Extraktion

- 5 Gesamt-RNA wurde aus 8 bis 10 primären Blattsegmenten (Länge 5 cm) mittels "RNA Extraction Buffer" (AGS, Heidelberg, Germany) extrahiert. Dazu wurden die zentrale Primärblattsegment von 5 cm Länge geerntet und in flüssigem Stickstoff in Mörsern
- 10 homogenisiert. Das Homogenisat wurde bis zur RNA-Extraktion bei -70°C gelagert. Aus dem tiefgefrorenen Blattmaterial wurde mit Hilfe eines RNA-Extraktions-Kits (AGS, Heidelberg) Gesamt-RNA extrahiert. Dazu wurden 200 mg des tiefgefrorenen Blattmaterials in einem Mikrozentrifugenröhrchen (2 mL) mit 1,7 mL RNA-
- 15 Extraktionspuffer (AGS) überschichtet und sofort gut durchmischt. Nach Zugabe von 200 µL Chloroform wurde erneut gut gemischt und bei Raumtemperatur 45 min auf einem Horizontalschüttler bei 200 U/min geschüttelt. Anschließend wurde zur Phasentrennung 15 min bei 20000 g und 4°C
- 20 zentrifugiert, die obere wäßrige Phase in ein neues Mikrozentrifugenröhrchen überführt und die untere verworfen. Die wäßrige Phase wurde erneut mit 900 µL Chloroform gereinigt, indem 3 mal für 10 sec homogenisiert und erneut zentrifugiert (s.o.) und abgehoben wurde. Zur Fällung der RNA wurde dann
- 25 850 µL 2-Propanol hinzugegeben, homogenisiert und für 30 bis 60 min auf Eis gestellt. Im Anschluß daran wurde für 20 min zentrifugiert (s.o.), vorsichtig der Überstand dekantiert, 2 mL 70 %iges Ethanol (-20°C) hinzu pipettiert, durchmischt und erneut 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dann wiederum
- 30 dekantiert und das Pelet vorsichtig mit einer Pipette von Flüssigkeitsresten befreit, bevor es an einem Reinluftarbeitsplatz im Reinluftstrom getrocknet wurde. Danach wurde die RNA in 50 µL DEPC-Wasser auf Eis gelöst, durchmischt und 5 min zentrifugiert (s.o.). 40 µl des Überstandes wurden als
- 35 RNA-Lösung in ein neues Mikrozentrifugenröhrchen überführt und bei -70°C gelagert.

- Die Konzentration der RNA wurde photometrisch bestimmt. Dazu wurde die RNA-Lösung 1:99 (v/v) mit destilliertem Wasser
- 40 verdünnt und die Extinktion (Photometer DU 7400, Beckman) bei 260 nm gemessen ( $E_{260\text{ nm}} = 1$  bei 40 µg RNA/mL). Gemäß der errechneten RNA-Gehalte wurden die Konzentrationen der RNA-Lösungen anschließend mit DEPC-Wasser auf 1 µg/µL angeglichen und im Agarosegel überprüft.

nachts 20°C, 50 bis 60 % relativer Luftfeuchte und einem 16-stündigen Licht / 8-stündigen Dunkelheitszyklus mit 30000 lux kultiviert.

- 5 Für die Inokulation von Gerstenpflanzen wurde echter Gerstenmehltau *Blumeria graminis* (DC) Speer f.sp. *hordei* Em. Marchal der Rasse A6 (Wiberg A (1974) *Hereditas* 77: 89-148) (BghA6) verwendet. Dieser wurde vom Institut für Biometrie, JLU Gießen bereitgestellt. Die Nachzucht des Inokulums erfolgte in
- 10 Klimakammern zu den gleichen Bedingungen, wie sie oben für die Pflanzen beschrieben sind, durch Übertragung der Konidien von befallenem Pflanzenmaterial auf regelmäßig angezogene, 7 Tage alte Gerstenpflanzen cv. Golden Promise bei einer Dichte von 100 Konidien/mm<sup>2</sup>.
- 15 Die Inokulation erfolgte auf primäre Blätter von Gerstenpflanzen mit nachfolgenden Konidien-Dichten: 5 Konidien/ mm<sup>2</sup> bei chemischer Induktion von Resistenz und makroskopischer Auswertung des Induktionserfolges, 50 Konidien/ mm<sup>2</sup> bei
- 20 Genexpressionsstudien und 150 Konidien/ mm<sup>2</sup> bei Überprüfung der Gentransformation mit transformierten Blattsegmenten. Die Inokulation mit BghA6 erfolgte unter Verwendung von 7 Tagen alten Keimlingen durch Abschütteln der Konidien bereits befallener Pflanzen in einem Inokulationsturm(soweit
- 25 nicht anders angegeben).

#### Beispiel 2: Modulation der BII Expression mit DCINA

- 2,6-Dichlorisonikotinsäure (DCINA, Syngenta AG, Basel, Schweiz; als 25% (w/w) Formulierung) wurde auf 4-Tage alte
- 30 Gerstenschößlinge der Sorte Pallas mittels Bodenbewässerung ("soil drench") in einer Endkonzentration von 8 mg/l Bodenvolumen appliziert. Die verwendete Suspension wurde mit Leitungswasser angesetzt. Als Kontrolle diente eine
- 35 Bodenbewässerung mit dem Trägermaterial (benetzbares Puder "wetable powder"). Nach drei Tagen wurden die Pflanzen mit *Blumeria graminis* (DC) Speer f.sp. *hordei* Em. Marchal der Rasse A6 (5 Konidien/ mm<sup>2</sup>) infiziert. Pflanzen mit chemisch induzierter Resistenz (CIR) wiesen ca. 70% weniger
- 40 Mehltauolonien auf als die entsprechenden Kontrollpflanzen, die nur mit der Trägersubstanz behandelt wurden (Fig. 9A).

Northern Blot und RT-PCT Blots wurden zur Bestimmung der BII Transkriptmengen durchgeführt und zeigten eine überraschende

Zur Überprüfung der RNA-Konzentrationen im horizontalen Agarosegel (1 % Agarose in 1 x MOPS-Puffer mit 0,2 µg/mL Ethidiumbromid) wurde 1 µL RNA-Lösung mit 1 µL 10 x MOPS, 1 µL Farbmarker und 7 µL DEPC-Wasser versetzt, nach Ihrer Größe bei 120 V Spannung im Gel in 1 x MOPS-Laufpuffer über 1,5 h aufgetrennt und unter UV-Licht fotografiert. Eventuelle Konzentrationsunterschiede der RNA-Extrakte wurden mit DEPC-Wasser ausgeglichen und die Anpassung erneut im Gel überprüft.

#### Beispiel 4: Klonierung der BI1 cDNA Sequenz aus Gerste

Der Vollllängenklon von hvBI1 (GenBank Acc.-No.: AJ290421) umfaßt am 3'-Ende zwei Stopp-Codons und am 5'-Ende ein potentiell

Start-Codon. Der ORF überspannt 247 Aminosäuren und zeigt die höchste Sequenzhomologie zu einem BI1-Gen aus Reis, Mais, Brassica napus und Arabidopsis thaliana (jeweils 86% Identität auf Nukleotidebene) sowie einem humanen BI1-Homolog (53% Ähnlichkeit) (Fig. 1 und 6). Die Aminosäuresequenz von hvBI1 umfaßt sieben potentielle Transmembrandomänen mit einer Orientierung des C-Terminus im Cytosol.

Nachfolgende Konstrukte wurden hergestellt:

- a) Amplifikation eines 478 bp Fragment der Gerste BI1 cDNA (GenBank Acc.-No.: AJ290421)

BI1-sense 5'-atggacgccttctactcgacctcg-3'

BI1-antisense 5'- gccagagcaggatcgacgcc-3'

- b) Amplifikation eines 513 bp *Ubi* cDNA Fragment (GenBank Acc.-No.: M60175)

UBI-sense 5'-ccaagatgcagatcttcgtga-3'

UBI-antisense 5'-ttcgcgataggtaaaagagca-3'

- c) Amplifikation eines 871 bp Vollllängen BI1 Leserahmens

BI1VL sense 5'-ggattcaacgcgagcgcaggacaagc-3'\_

BI1VL antisense 5'-gtcgacgcggtgacggtatctacatg-3'

Die erhaltenen Fragmente wurden in den Vektor pGEM-T mittels T-Überhang-Ligation ligiert und dienten als Ausgangsplasmide für die Herstellung von Sonden (z.B. für Northern-Blot) bzw. dsRNA.

Die einzelnen Konstrukte trugen die Bezeichnung pGEMT-BI1 , pGEMT-BI1VL(240) und pGEMT-UBI.

Das BI1-Volllängenprodukt wurde aus pGEMT in die SalI Schnittstelle des pGY-1 vektors (Schweizer, P., Pokorny, J., Abderhalden, O. & Dudler, R. (1999) Mol. Plant-Microbe Interact. 12, 647-654) unter Verwendung der SalI-Schnittstelle in pGEMT und mittels der dem BI1VL antisense Primer angefügten SalI-Schnittstellen umklontiert. Vektoren mit sense (pBI-1) und antisense Orientierung (pasBI-1) wurden isoliert und resequenziert. Die Vektoren enthalten die BI-1 Sequenz unter Kontrolle des CaMV 35S Promotors.

#### Beispiel 5: Reverse Transkription - Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Zum Nachweis von niedrigen Transkriptmengen wurde eine semi-quantitative RT-PCR unter Verwendung des "OneStep RT-PCR Kit" (Qiagen, Hilden, Germany) durchgeführt. Dabei wurde RNA (Isolation s.o.) zuerst in cDNA übersetzt (Reverse Transkription) und in einer anschließenden PCR-Reaktion mit spezifischen Primern die gesuchte cDNA amplifiziert. Um die Ausgangsmenge an Matrizen RNA abzuschätzen, wurde die Amplifikation während der exponentiellen Phase (nach 20 Zyklen) unterbrochen um Unterschiede in der Ziel-RNA wiederzuspiegeln. Die PCR Produkte wurden über ein Agarosegel aufgetrennt, denaturiert, auf Nylonmembranen geblottet und mit spezifischen, nicht-radioaktiv-markierten Sonden unter stringenten Standardbedingungen detektiert. Hybridisierung, Waschschrirte und Immunodetektion erfolgten wie unter "Northern Blot" beschrieben. Für die einzelnen Reaktionen (25 µL-Ansatz) wurden unter Verwendung des "One Step RT-PCR Kit" (Qiagen, Hilden, Deutschland) zusammengegeben:

1000 ng Gesamt-RNA einer bestimmten Probe  
0,4 mM dNTPs,  
jeweils 0,6 µM sense- und antisense-Primer  
0,10 µl RNase-Inhibitor  
1 µL Enzymmix in 1x RT-Puffer

Die cDNA-Synthese (reverse Transkription) erfolgte für 30 min bei 50°C. Anschließend wurde die Reverse Transkriptase für 15 min bei 95°C inaktiviert, was zugleich Aktivierung der DNA-Polymerase und Denaturierung der cDNA bewirkt. Anschließend

- folgt eine PCR gemäß nachfolgendem Programm: 1 min mit 94 °C; 25 Zyklen mit 1 min mit 94 °C; 1 min mit 54°C und 1 min mit 72°C; abschließend 10 min mit 72°C. Dann Lagerung bei 4°C bis zur Weiterverarbeitung. Die PCR-Produkte wurden im 1xTBE-Agarosegel mit Ethidiumbromid aufgetrennt. Für die einzelnen Ansätze wurden mit den oben angegebenen Primer-Paaren amplifiziert.

#### Beispiel 6: Northern-Blot Analyse

- 10 Zur Vorbereitung des Northern-Blottings wurde die RNA im Agarosegel unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt. Ein Teil RNA-Lösung (entsprechend 10 µg RNA) wurde dazu mit gleichem Volumen Probenpuffer (mit Ethidiumbromid) gemischt, 5 min bei 94°C denaturiert, 5 min auf Eis gestellt, kurz zentrifugiert und
- 15 aufs Gel aufgetragen. Das 1 x MOPS-Gel (1,5 % Agarose, *ultra pure*) enthielt 5 Volumenprozent konzentrierte Formaldehydlösung (36,5 % [v/v]). Die RNA wurde bei 100 V 2 h lang aufgetrennt und anschließend geblottet.
- 20 Das Northern-Blotting erfolgte als aufwärtsgerichteter RNA-Transfer im Kapillarstrom. Das Gel wurde dazu zunächst 30 min in 25 mM Natriumhydrogen/dihydrogenphosphat-Puffer (pH 6,5) geschwenkt und zurechtgeschnitten. Ein Whatmanpapier wurde so vorbereitet, dass es auf einer horizontalen Platte auflag und
- 25 auf 2 Seiten in eine Wanne mit 25 mM Natriumhydrogen/dihydrogenphosphat-Puffer (pH 6,5) ragte. Auf dieses Papier wurde das Gel aufgelegt, wobei nicht bedeckte Teile des Whatmanpapiers mit einer Plastikfolie abgedeckt wurden. Das Gel wurde dann mit einer positiv geladenen
- 30 Nylonmembran (Boehringer-Mannheim) luftblasenfrei abgedeckt, wonach die Membran wiederum mit saugfähigem Papier in mehreren Lagen etwa 5 cm hoch bedeckt wurde. Das saugfähige Papier wurde noch mit einer Glasplatte und einem 100 g Gewicht beschwert. Das Blotting erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur. Die Membran
- 35 wurde kurz in A. bidest. geschwenkt und zur RNA-Fixierung mit einer Lichtenergie von 125 mJ im *Crosslinker* (Biorad) UV-Licht bestrahlt. Die Überprüfung des gleichmäßigen RNA-Transfers auf die Membran erfolgte auf der UV-Lichtbank.
- 40 Zur Detektion von Gersten mRNA wurden 10 mg Gesamt-RNA aus jeder Probe über ein Agarosegel aufgetrennt und mittels Kapillartransfer auf eine positiv-geladene Nylonmembran geblottet. Die Detektion erfolgte mit dem DIG-Systeme nach Herstellerangaben unter Verwendung von Digoxigenin-markierten

antisense-RNA Sonden (wie beschrieben in Hückelhoven R et al. (2001) Plant Mol Biol 47:739-748).

Herstellung der Sonden: Zur Hybridisierung mit den zu  
5 detektierenden mRNAs wurden mit Digoxigenin oder Fluoreszein  
markierte RNA Sonden hergestellt. Diese wurden durch in vitro  
Transkription eines PCR-Produktes mittels einer T7 oder SP6 RNA  
Polymerase mit markierten UTPs erstellt. Als Vorlage für die PCR  
gestützte Amplifikation dienten die oben beschriebenen  
10 Plasmidvektoren pGEMT-BI1, pGEMT-UBI. Je nach Orientierung des  
Inserts wurden unterschiedliche RNA-Polymerasen zur Herstellung  
des antisense-Stranges herangezogen. Die T7-RNA-Polymerase wurde  
für für pGEMT-BI1 verwendet, die SP6-RNA-Polymerase für pGEMT-  
UBI. Das Insert der einzelnen Vektor wurde über PCR mit  
15 flankierenden Standard-Primern (M13 fwd und rev) amplifiziert.  
Die Reaktion lief dabei mit folgenden Endkonzentrationen in  
einem Gesamtvolumen von 50 µL PCR-Puffer (Silverstar) ab:

M13-fwd: 5'-GTAAAACGACGGCCAGTG-3'  
20 M13-Rev: 5'-GGAAACAGCTATGACCATG-3'

10 % Dimethylsulfoxid (v/v)  
je 2 ng/µL Primer (M13 forward und reversed)  
1,5 mM MgCl<sub>2</sub>,  
25 0,2 mM dNTPs,  
4 Units Taq-Polymerase (Silverstar),  
2 ng/µL Plasmid-DNA.

Die Amplifikation verlief in einem Thermocycler (Perkin-Elmer  
30 2400) temperaturgesteuert mit nachfolgendem Temperaturprogramm:  
94°C für 3 min; 30 Zyklen mit 94°C für 30 sek, 58°C für 30 sek  
und 72°C für 1,2 min; 72°C für 5 min; anschließend Kühlung bei  
4°C bis zur Weiterverarbeitung. Der Erfolg der Reaktion wurde im  
1 %igen Agarosegel überprüft. Die Produkte wurden anschließend  
35 mit einem "High Pure PCR-Product Purification Kit" (Boehringer-  
Mannheim) aufgereinigt. Man erhielt etwa 40 µL Säuleneluat, das  
erneut im Gel überprüft und bei -20°C gelagert wurde.

Die RNA Polymerisation, die Hybridisierung und die Immuno-  
40 detektion wurden weitestgehend nach Angaben des Herstellers  
des Kits zur nicht-radioaktiven RNA-Detektion durchgeführt (DIG  
System User's Guide, DIG-Luminescence detection Kit, Boehringer-  
Mannheim, Kogel et al. (1994) Plant Physiol 106:1264-1277). 4 µl  
gereinigtes PCR-Produkt wurden mit 2 µL Transskriptionspuffer,



2 µl NTP-Markierungsmix, 2 µl-NTP-Mix und 10 µl DEPC-Wasser versetzt. Anschließend wurden 2 µL der T7-RNA-Polymeraselösung zu pipettiert. Die Reaktion wurde dann 2 h bei 37°C durchgeführt und anschließend mit DEPC-Wasser auf 100 µL aufgefüllt. Die RNA-  
5 Sonde wurde im Ethidiumbromidgel detektiert und bei -20°C gelagert.

Zur Vorbereitung der Hybridisierung wurden die Membranen zunächst 1 h bei 68°C in 2 x SSC (*Salt, Sodiumcitrate*), 0,1 %  
10 SDS-Puffer (*Natriumdodecylsulfat*) geschwenkt, wobei der Puffer 2 bis 3 mal erneuert wurde. Die Membranen wurden anschließend an die Innenwand auf 68°C vorgeheizter Hybridisierungsröhren angelegt und 30 min mit 10 mL *Dig-Easy*-Hybridisierungspuffer im vorgeheizten Hybridisierungssofen inkubiert. Währenddessen wurden  
15 10 µL Sondenlösung in 80 µL Hybridisierungspuffer bei 94°C für 5 min denaturiert, anschließend auf Eis gestellt und kurz zentrifugiert. Zur Hybridisierung wurde die Sonde dann in 10 mL 68°C warmem Hybridisierungspuffer überführt, und der Puffer in der Hybridisierungsröhre durch diesen Sondenpuffer ersetzt. Die  
20 Hybridisierung erfolgte dann ebenfalls bei 68°C über Nacht. Vor Immundetektion von RNA-RNA Hybriden wurden die Blots stringent zweimal für jeweils 20 min in 0.1 % (w/v) SDS, 0.1 x SSC bei 68°C gewaschen. Zur Immundetektion wurden die Blots zunächst zweimal für 5 min bei RT in 2 x SSC, 0,1 % SDS geschwenkt.  
25 Anschließend erfolgten 2 stringente Waschschrte bei 68°C in 0,1 x SSC, 0,1 % SDS für je 15 min. Die Lösung wurde anschließend durch Waschpuffer ohne Tween ersetzt. Es wurde 1 min geschüttelt und die Lösung durch Blocking-Reagenz ausgetauscht. Nach weiteren 30 min Schütteln wurden 10 µL Anti-  
30 Fluoreszein-Antikörperlösung hinzugefügt und weitere 60 min geschüttelt. Es folgten zwei 15 minütige Waschschrte in Waschpuffer mit Tween. Die Membran wurde anschließend 2 min in Substratpuffer äquilibriert und nach Abtropfen auf eine Kopierfolie überführt. Auf der "RNA-Seite" der Membran wurde  
35 dann ein Gemisch aus 20 µL CDP-Star™ und 2 mL Substratpuffer gleichmäßig verteilt. Im Anschluß wurde die Membran mit einer zweiten Kopierfolie abgedeckt und an den Rändern mit Hitze luftblasenfrei und wasserdicht verschweißt. Die Membran wurde dann in einer Dunkelkammer für 10 min mit einem Röntgenfilm  
40 bedeckt und dieser anschließend entwickelt. Je nach Stärke der Lumineszenzreaktion wurde die Belichtungszeit variiert.

Wenn nicht extra gekennzeichnet waren die Lösungen im Lieferumfang des Kits enthalten (*DIG-Luminescence detection Kit*,

Boehringer-Mannheim). Alle anderen wurden aus folgenden Stammlösungen durch Verdünnung mit autoklaviertem, destilliertem Wasser hergestellt. Alle Stammlösungen wurden, wenn nicht anders spezifiziert, mit DEPC (wie DEPC-Wasser) angesetzt und  
5 anschließend autoklaviert.

- DEPC-Wasser: Destilliertes Wasser wird über Nacht bei 37°C mit Diethylpyrokarbonat (DEPC, 0,1 %, w/v) behandelt und anschließend autoklaviert
- 10 - 10 x MOPS-Puffer: 0,2 M MOPS (Morpholin-3-propansulfonsäure), 0,05 M Natriumacetat, 0,01 M EDTA, pH mit 10 M NaOH auf pH 7,0 eingestellt
- 15 - 20 x SSC (Natriumchlorid-Natriumzitat, *Salt-Sodiumcitrate*): 3 M NaCl, 0,3 M triNatriumcitrat x 2 H<sub>2</sub>O, pH mit 4 M HCl auf pH 7,0 eingestellt.
- 1 % SDS (Natriumdodecylsulfat, *Sodiumdodecylsulfate*) Natriumdodecylsulfat (w/v), ohne DEPC
- 20 - RNA-Probenpuffer: 760 µL Formamid, 260 µL Formaldehyd, 100 µL Ethidiumbromid (10 mg/mL), 80 µL Glycerol, 80 µL Bromphenolblau (gesättigt), 160 µL 10 x MOPS, 100 µL Wasser.
- 25 - 10 x Waschpuffer ohne Tween: 1,0 M Maleinsäure, 1,5 M NaCl; ohne DEPC, mit NaOH (fest, ca. 77 g) und 10 M NaOH auf pH 7,5 einstellen.
- 30 - Waschpuffer mit Tween: aus Waschpuffer ohne Tween mit Tween (0,3 %, v/v)
- 10 x Blockingreagenz: 50 g Blockingpulver (Boehringer-Mannheim) in 500 mL Waschpuffer ohne Tween suspendieren.
- 35 - Substratpuffer: 100 mM Tris (Trishydroxymethylamino-methan), 150 mM NaCl mit 4 M HCl auf pH 9,5 einstellen.
- 10 x Farbmarker: 50 % Glycerol (v/v), 1,0 mM EDTA pH 8,0,
- 40 0,25 % Bromphenolblau (w/v), 0,25 % Xylencyanol (w/v).

Eine B1 Expression wurde wie beschrieben mit RT-PCR und cDNA Gelblots untersucht und ergab, dass B1 überwiegend im Mesophyllgewebe von Blättern exprimiert wird, während Ubiquitin

konstitutiv gleichmäßig in Epidermis und Mesophyll exprimiert wird (Fig. 8).

5 Ferner ist eine Expression von BI1 als Reaktion auf Behandlung der Pflanzen mit toxischen Kulturfiltraten von *Bipolaris sorokiniana* zu beobachten. Primärblätter der Gerste zeigen typische nekrotische Flecke (leaf spot blotch symptoms) nach Behandlung der Pflanzen mit toxischen Kulturfiltraten von *Bipolaris sorokiniana* (durchgeführt wie bei Kumar et al. 2001  
10 beschrieben). Die Blattnekrosen waren erkennbar 48 h nach Behandlung. Der beobachtete Gewebeschaden war in der Bgh-resistenten Linie BCIngrid-mlo5 (I22) deutlicher ausgeprägt als in der Elterlinie Ingrid (Mlo-Genotype, Kumar et al. 2001). Die Expression von BI1 korreliert 72 h nach Behandlung (hat) mit der  
15 Ausprägung der Blattnekrosen (Fig. 12).

#### Beispiel 7:

Die zur stabilen, mesophyll-spezifischen Überexpression wird der  
20 Oxalat-Oxidase Promoter (germin 9f-2.8) aus Weizen eingesetzt. In Gerste ist die entsprechende Oxalat-Oxidase Expression Mesophyll-spezifisch, schwach konstitutiv und Pathogen-responsiv (Gregersen PL et al. (1997) *Physiol Mol Plant Pathol* 51: 85-97). Er kann deshalb zur Mesophyll-spezifischen Expression von BI1  
25 genutzt werden. Zur Kontrolle wird HvBI1 unter Kontrolle des Mais-Ubiquitinpromoters (Christensen AH et al. (1992) *Plant Mol Biol* 18:675-689) oder des Reis-Aktinpromoters überexprimiert (Zhang W et al. (1991) *Plant Cell* 3:1155-1165). Eingesetzt werden nachfolgende Konstrukte:

- 30
- a) pUbiBI-1 (SEQ ID NO: 33; für transiente Gerstentransformation und Weizentransformation mit Partikel Bombardement. Expression von BI-1 unter Kontrolle des Mais Ubiquitin Promotors).

35

  - b) pLol14UbiBI-1 (SEQ ID NO: 34; erhalten durch Umklonierung der Ubi/BI-1 Expressionscassette als EcoR1-Fragment aus pUbiBI-1 in pLol14-GUS-Kan; Binärer Vektor für transiente Gerstentransformation mit *A. tumefaciens*)

40

  - c) pOXoBI-1 (SEQ ID NO: 35; Mesophyllspezifischer TaGermin 9f-2.8 Promoter vor BI1 zur Weizentrafo über Patikelbombardement.

d) pLol140XoBI-1 (SEQ ID NO: 36)

Es werden Wildtypgerste und Weizen sowie *mlo*-Gerste transformiert, vermehrt und geselbstet. Die Transformation von Gerste und Weizen erfolgt wie beschrieben (Repellin A et al. (2001) Plant Cell, Tissue and Organ Culture 64: 159-183): Dazu werden Kalli aus unreifen Weizen- (bzw. Gersten-) embryonen über biolistischen Gentransfer mit Mikroprojektilen transformiert. Dabei werden pUC basierte Vektoren zusammen mit Vektoren die Selektionsmarker tragen kotransformiert. Anschließend werden die Embryonen auf Selektionsmedium kultiviert und regeneriert. Gerste wird mit Hilfe von *Agrobacterium tumefaciens* transformiert. Dabei wird ein binärer Vektor auf Basis von pCambia\_1301 eingesetzt. Unreife Embryonen von Gerste werden mit *A. tumefaciens* cokultiviert, selektiert und anschließend regeneriert (Repellin A et al. (2001) Plant Cell, Tissue and Organ Culture 64: 159-183; Horvath H et al. (2003) Proc Natl. Acad Sci USA 100: 365-369; Horvath H et al. (2002) in Barley Science, eds. Slafer, G. A., Molina-Cano, J. L., Savin, R., Araus, J. L. & Romagosa, J. (Harworth, New York), pp. 143-176; Tingay S et al. (1997) Plant J. 11: 1369-1376).

Die transgenen (rekombinanten) Gersten- und Weizenpflanzen der T1 oder T2-Generation werden auf Resistenz gegenüber hemibiotrophen und perthotrophen Erregern geprüft. Dazu werden die Blätter mit verschiedenen Pathogenen inokuliert. Als biotrophe Erreger werden Gerstenmehltau (*Blumeria graminis* f.sp. *hordei*) und Braunrost (*Puccinia hordei*) verwendet. Als Maß der Mehltauanfälligkeit wird die Pustelzahl pro Blattfläche 5-7 Tage nach Inokulation mit 2-5 Konidien pro mm<sup>2</sup> Blattfläche ausgewertet (Beßer K et al. (2000) Mol Plant Pathology 1: 277-286). Als hemibiotrophe Erreger werden *Bipolaris sorokiniana* n und *Magnaporthe grisea* verwendet. Die Inokulation erfolgt wie zuvor beschrieben (Kumar J et al. (2001) Phytopathology 91: 127-133; Jarosch B et al. (1999) Mol Plant Microbe Inter 12: 508-514). Als Maß für die Anfälligkeit dient die Anzahl und Größe der Blattläsionen 2 bis 6 Tage nach Sprühinokulation mit Konidien (Kumar J et al. (2001) Phytopathology 91:127-133; Jarosch B et al. (1999) Mol Plant Microbe Inter 12:508-514; Jarosch B et al. (2003) Mol Plant Microbe Inter 16:107-114.). Als perthotropher Erreger wird *Fusarium graminearum* verwendet.

Zur Bestimmung der Fusarium Head Blight (FHB) Typ I-Resistenz werden Weizenähren in einem frühen Blühstadium mit einer

Makrokonidien-Suspension (ca.  $2 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$ ) von *Fusarium graminearum* bzw. *Fusarium culmorum* besprüht. Die inokulierten Pflanzen werden für 3 Tage in eine Nebelkammer mit 25°C Lufttemperatur und 100% relativer Luftfeuchte transferriert.

5    Danach werden die Pflanzen im Gewächshaus unter Dauerlicht bei einer Temperatur von 20°C inkubiert und die Stärke der FHB-Symptome über die Ähre hinweg nach 5, 7 und 8 Tagen evaluiert.

Zur Quantifizierung der Fusarium Head Blight (FHB) Typ II-Resistenz werden jeweils 10 - 20 µl Aliquots einer Makrokonidien-Suspension (ca.  $2 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$ ) von *Fusarium graminearum* bzw. *Fusarium culmorum* in einzelne, relativ zentral gelegene Ährchen von Weizenpflanzen injiziert. Die inokulierten Pflanzen werden für 3 Tage in eine Nebelkammer mit 25°C Lufttemperatur und 100% relativer Luftfeuchte transferriert. Danach werden die Pflanzen im Gewächshaus unter Dauerlicht bei einer Temperatur von 20°C inkubiert und die Ausbreitung der FHB-Symptome über die Ähre hinweg nach 7, 14 und 21 Tagen evaluiert. Die Ausbreitung der Symptome über die Ähre (das sog. Fusarium-Spreading) wird als Mass für die FHB Typ II-Resistenz genommen.

Vergleichsbeispiel 1: Transiente Bt1 Expression in der Epidermis und Evaluation der Pilzpathogenentwicklung

25 Gerste cv Ingrid Blattsegmente wurden mit einer pGY-BI1 zusammen  
mit einem GFP-Expressionsvektor transformiert. Anschließend  
wurden die Blätter mit Bgh inokuliert und das Ergebnis nach 48 h  
mittels Licht- und Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Die  
30 Penetration in GFP-exprimierenden Zellen wurde mittels Detektion  
von Haustorien in lebenden Zellen und durch Bewertung der  
Pilzentwicklung aufin eben diesen Zellen beurteilt. Es wurde ein  
Verfahren zur transienten Transformation eingesetzt, das bereits  
für die biolistische Einführung von DNA und RNA in epidermale  
35 Zellen von Gerstenblättern beschrieben wurde (Schweizer P et al.  
(1999) Mol Plant Microbe Interact 12:647-54; Schweizer P et al.  
(2000) Plant J 2000 24:895-903).

40 Für Microcarrier-Präparation wurden 55 mg Wolframpartikel (M 17, Durchmesser 1,1  $\mu\text{m}$ ; Bio-Rad, München) zweimal mit 1 ml autoklaviertem Destilliertem Wasser und einmal mit 1 mL absolutem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 1 ml 50 %igem Glycerin aufgenommen (ca. 50 mg/ml Stammlösung). Die Lösung

wurde mit 50%igem Glycerin auf 25 mg/ml verdünnt, vor Gebrauch gut gemischt und im Ultraschallbad suspendiert.

- 5 Zur Microcarrier-Beschichtung wurden pro Schuß 0,3 µg Plasmid pGFP (GFP unter Kontrolle des CaMV 35S Promotors; Schweizer P et al. (1999) *Mol Plant-Microbe Interact* 12:647-654.), 0,7 µg Leervektor pGY bzw. pGY-BI1 (1 µL), 12,5 µl Wolframpartikel-Suspension (25 mg/ml; entsprechend 312 µg Wolframpartikel), 12,5 µl 1 M Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-Lösung (pH 10) tropfenweise unter ständigem
- 10 Mischen zusammengegeben, 10 min bei RT stehengelassen, kurz zentrifugiert und 20 µl vom Überstand abgenommen. Der Rest mit den Wolframpartikel wird resuspendiert (Ultraschallbad) und ins Experiment eingesetzt.
- 15 Es wurden ca. 4 cm lange Segmente von Gerstenprimärblättern verwendet. Die Gewebe wurden auf 0,5 % Phytagar (GibcoBRL™ Life Technologies™, Karlsruhe) mit 20 µg/ml Benzimidazol in Petrischalen (6,5 cm Durchmesser) gelegt und direkt vor dem Partikelbeschuss an den Rändern mit einer Schablone mit einer
- 20 rechteckigen Aussparung von 2,2 cm x 2,3 cm abgedeckt. Die Schalen wurden nacheinander auf den Boden der Vakuumkammer (Schweizer P et al. (1999) *Mol Plant Microbe Interact* 12:647-54) gestellt, über dem ein Nylonnetz (Maschenweite 0,2 mm, Millipore, Eschborn) als Diffusor auf einer Lochplatte
- 25 eingeschoben war (5 cm über dem Boden, 11 cm unterhalb des Macrocarriers, s.u.), um Partikelklumpen zu zerstreuen und den Partikelstrom abzubremesen. Der oben an der Kammer angebrachte Macrocarrier (Plastik-Sterilfilterhalter, 13 mm, Gelman Sciences, Swinney, UK) wurde je Schuss mit 5,8 µL DNA-
- 30 beschichteten Wolframpartikeln (Microcarrier, s.u.) beladen. Mit einer Membranvakuumpumpe (Vacuubrand, Wertheim) wurde der Druck um 0,9 bar in der Kammer reduziert und die Wolframpartikel mit 9 bar Heliumgasdruck auf die Oberfläche des Pflanzengewebes geschossen. Sofort danach wurde die Kammer belüftet. Zur
- 35 Markierung transformierter Zellen wurden die Blätter mit dem Plasmid (pGFP; Vektor auf pUC18-Basis, CaMV 35S-Promoter/Terminator-Kassette mit insertiertem GFP-Gen; Schweizer P et al. (1999) *Mol Plant Microbe Interact* 12:647-54; zur Verfügung gestellt von Dr. P. Schweizer, Institut
- 40 für Pflanzengenetik IPK, Gatersleben, Deutschland) beschossen. Vor dem Schießen eines anderen Plasmids wurde der Macrocarrier jeweils gründlich mit Wasser gereinigt. Nach vierstündiger Inkubation nach dem Beschuß bei leicht geöffneten Petrischalen, RT und Tageslicht wurden die Blätter mit 100 Konidien/mm<sup>2</sup> des

- Echten Gerstenmehltaupilzes (Rasse A6; *Blumeria graminis f.sp. hordei* Mehltau A6) inokuliert und für weitere 40 h unter gleichen Bedingungen inkubiert. Anschließend wurde die Penetration ausgewertet. Das Ergebnis (z.B. die
- 5 Penetrationseffizienz, definiert als prozentualer Anteil angegriffener Zellen, die ein mit reifem Haustorium und einer Sekundärhyphae ("secondary elongating hyphae"), wurde mittels Fluoreszenz- und Lichtmikroskopie analysiert. Eine Inokulation mit 150 Conidia/mm<sup>2</sup> ergibt eine Angriffsfrequenz von ca. 50 %
- 10 der transformierten Zellen. Für jedes einzelne Experiment wurde eine minimale Anzahl von 100 Interaktionsstellen ausgewertet. Transformierte (GFP exprimierende) Zellen wurden unter Anregung mit blauem Licht identifiziert. Drei verschiedene Kategorien von transformierten Zellen konnten unterschieden werden:
- 15
- 1 Penetrierte Zellen, die ein leicht erkennbares Haustorium beinhalten. Eine Zelle mit mehr als einem Haustorium wurde als eine Zelle gewertet.
  - 20 2. Zellen, die durch ein Pilz-Appressorium zwar angegriffen wurden, aber kein Haustorium beinhalten. Eine Zelle die mehrfach von Bgh angegriffen wurden, aber kein Haustorium enthält, wurde als eine Zelle gewertet.
  - 25 3. Zellen die nicht durch Bgh angegriffen sind.

- Stomatazellen und Stomatanebenzellen wurden von der Bewertung ausgeschlossen. Oberflächenstrukturen von Bgh wurden mittels Lichtmikroskopie oder Fluoreszenzfärbung des Pilzes mit 0,3 %
- 30 Calcofluor (w/v in Wasser) für 30 sec analysiert. Die Entwicklung des Pilzes kann leicht durch Fluoreszenzmikroskopie nach Anfärbung mit Calcofluor evaluiert werden. In BI1-dsRNA transformierten Zellen entwickelt der Pilz zwar ein primäres und ein appressoriales Keimschlauch ("Germ-Tube") aber kein
- 35 Haustorium. Haustoriumausbildung ist eine Vorbedingung für die Bildung einer Sekundärhyphae.

- Die Penetrationseffizien (Penetrationsraten) errechnet sich als Anzahl der penetrierten Zellen durch Anzahl
- 40 der attackierten Zellen multipliziert mit 100.

Die Penetrationseffizienz dient der Bestimmung des Suszeptibilität von Zellen, die mit pGY-BI1 transfiziert sind im Vergleich zu Zellen die mit einer Leervektorkontrolle transformiert sind

- (Fig. 10). Es wurde beobachtet, dass die BI1 Überexpression die Penetrationshäufigkeit von Bgh signifikant erhöht (Fig. 10). In sechs unabhängigen Experimenten bewirkte die Überexpression in der suszeptiblen Gerstensorte Ingrid eine signifikante Erhöhung der durchschnittlichen Penetrationseffizienz (PE) von 47 % auf 72 % (165 % der Kontrollen) bei Zellen die BI1 überexprimieren im Vergleich zu Zellen, die mit Leervektor transformiert wurden (Kontrolle) (Fig. 10).
- 10 Ferner wurden epidermale Zellen der Bgh-resistenten *mlo5*-Gerste mit dem BI1 Überexpressionskonstrukt pGY-1 wie oben beschrieben transient transformiert. Der *mlo5*-Genotyp in einem Pallas bzw. Ingrid Hintergrund zeigt eine geringfügige Anfälligkeit gegen Bgh. In 7 unabhängigen Experimenten wurde in Kontrollpflanzen
- 15 (Transformation mit Leervektor und GFP-Vektor) eine Penetrationseffizienz von minimal 0 bis maximal 11 % gefunden. Überraschenderweise ergab eine BI1 Überexpression (pGY-BI1) eine nahezu vollständige Rekonstitution der suszeptiblen Phänotyps, d.h. es erfolgte ein nahezu kompletter Bruch der *mlo*-Resistenz.
- 20 Die durchschnittliche Penetrationseffizienz von Bgh auf Ingrid-*mlo5* und Pallas-*mlo5* Blattsegmenten steigt von 4 % auf 23 %, bzw. von 6 % auf 33 % (Fig. 11). Dies bedeutet einen relativen Anstieg der Penetration auf 520 % bzw. 510 % der Kontrollen. Desweiteren erhöhte die Überexpression von BI1 im Gerste cv
- 25 Manchuria die Anfälligkeit gegen das Weizenpathogen *Blumeria graminis* f.sp. *tritici* in drei unabhängigen Experimenten von 0 bis 4 % auf 19 bis 27 % (Fig. 13).



## Patentansprüche

1. Verfahren zur Erzeugung oder Erhöhung der Resistenz gegen  
mindestens einen biotischen oder abiotischen Streßfaktor in  
Pflanzen, wobei nachfolgende Arbeitsschritte umfasst sind
  - a) Erhöhung der Proteinmenge oder Funktion mindestens ei-  
nes Bax Inhibitor-1 (BI1) Proteins in mindestens einem  
pflanzlichen Gewebe mit der Maßgabe, dass die Expressi-  
on in der Blattepidermis im wesentlichen unverändert  
bleibt oder reduziert wird, und
  - b) Auswahl der Pflanzen, bei denen im Vergleich zur Aus-  
gangspflanze eine Resistenz gegen mindestens einen bio-  
tischen oder abiotischen Streßfaktor besteht oder er-  
höht ist.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei der Streßfaktor ein pflanz-  
liches Pathogen ist.
3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, wobei der  
Streßfaktor ein nekrotrophes oder hemibiotrophes Pathogen  
ist.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei das BI-1  
Protein mindestens eine Sequenz umfaßt, die eine Homologie  
von mindestens 50% aufweist zu mindestens einem BI1-  
Konsensusmotiv ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus
  - a) H(L/I)KXVY,
  - b) AXGA(Y/F)XH,
  - c) NIGG,
  - d) P(V/P)(Y/F)E(E/Q)(R/Q)KR,
  - e) (E/Q)G(A/S)S(V/I)GPL,
  - f) DP(S/G)(L/I)(I/L),
  - g) V(G/A)T(A/S)(L/I)AF(A/G)CF(S/T),
  - h) YL(Y/F)LGG,
  - i) L(L/V)SS(G/W)L(S/T)(I/M)L(L/M)W, und
  - j) DTGX(I/V)(I/V)E.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei das BI-Protein kodiert wird durch ein Polypeptid, das mindestens eine Sequenz umfaßt ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:
- 5 a) den Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32 oder 38, und
- 10 b) Sequenzen, die eine Identität von mindestens 50% zu einer der Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32 oder 38 aufweisen,
- 15 c) Sequenzen die mindestens eine Teilsequenz von mindestens 10 zusammenhängenden Aminosäureresten einer der Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32 oder 38 umfassen.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die Erhöhung der Proteinmenge oder Funktion mindestens eines BI-Proteins durch rekombinante Expression des besagten BI-Proteins unter Kontrolle eines wurzel-, knollen- oder mesophyll-spezifischen Promotors realisiert wird.
- 20 7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, umfassend
- 25 (a) stabile Transformation einer pflanzlichen Zelle mit einer rekombinanten Expressionskassette enthalten eine für ein BI-Protein kodierende Nukleinsäuresequenz in funktioneller Verknüpfung mit einem gewebespezifischen Promotor, wobei der Promotor im wesentlichen keine
- 30 Aktivität in der Blattepidermis aufweist und wobei der Promotor in Bezug auf die besagte das BI-Protein kodierende Nukleinsäuresequenz heterolog ist.
- 35 (b) Regeneration der Pflanze aus der pflanzlichen Zelle, und
- (c) Expression besagter für ein BI-Protein kodierende Nukleinsäuresequenz in einer Menge und für eine Zeit hinreichend um eine Streß- und/oder Pathogenresistenz in
- 40 besagter Pflanze zu erzeugen oder zu erhöhen.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei die Pflanze aus den monokotyledonen und dikotyledonen Pflanzen ausgewählt ist.
- 45

- 5 9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei die Pflanze ausgewählt ist aus der Gruppe der monokotyledonen Pflanzen bestehend aus Weizen, Hafer, Hirse, Gerste, Roggen, Mais, Reis, Buchweizen, Sorghum, Triticale, Dinkel, Leinsamen oder Zuckerrohr.
- 10 10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei die Expression des Bax Inhibitor-1 (BI-1) im Mesophyll erhöht wird.
- 15 11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, wobei die Pflanze einen mlo-resistenten Phänotyp aufweist, oder die Expression oder Funktion von MLO, RacB und/oder NaOx mindestens in der Epidermis inhibiert oder im Vergleich zu einer Kontrollpflanze reduziert ist und/oder die Expression oder Funktion von PEN2, SNAP34 und/oder PEN1 mindestens in der Epidermis erhöht wird im Vergleich zu einer Kontrollpflanze.
- 20 12. Polypeptidsequenz kodierend für BI1 Protein umfassend mindestens eine Sequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus
- 25 a) den Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 28, 30, 32 oder 38,
- 30 b) Sequenzen die eine Homologie von mindestens 90%, bevorzugt mindestens 95%, besonders bevorzugt mindestens 98% zu einer der Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 28, 30, 32 oder 38 aufweisen, und
- 35 c) Sequenzen die mindestens 10, bevorzugt mindestens 20, besonders bevorzugt mindestens 30 zusammenhängende Aminosäuren einer der Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 28, 30, 32 oder 38 umfassen.
- 40 13. Nukleinsäuresequenz kodierend für eine Polypeptidsequenz gemäß Anspruch 12.
- 45 14. Rekombinante Expressionskassette enthalten eine für ein BI-Protein kodierende Nukleinsäuresequenz in funktioneller Verknüpfung mit einem gewebespezifischen Promotor, wobei der Promotor im wesentlichen keine Aktivität in der Blattepidermis aufweist und wobei der Promotor in Bezug auf die besagte das BI-Protein kodierende Nukleinsäuresequenz heterolog ist.

15. Rekombinante Expressionskassette nach Anspruch 14, wobei
- a) das BII-Protein wie in einem der Ansprüche 4, 5 oder 11 definiert ist, und/oder
  - b) der gewebespezifische Promotor ausgewählt ist aus der Gruppe der wurzel-, knollen- oder mesophyll-spezifischen Promotoren.
16. Rekombinanter Vektor enthaltend eine Expressionskassette gemäß einem der Ansprüche 14 oder 15.
17. Rekombinanter Organismus enthaltend mindestens eine Expressionskassette gemäß einem der Ansprüche 14 oder 15 und/oder mindestens einen Vektor gemäß Anspruch 16.
18. Rekombinanter Organismus nach Anspruch 17 ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Bakterien, Hefen, nicht-menschlichen Tieren und Pflanzen.
19. Rekombinanter Organismus nach Anspruch 17 oder 18, ausgewählt aus der Gruppe der Pflanzen bestehend aus Weizen, Hafer, Hirse, Gerste, Roggen, Mais, Reis, Buchweizen, Sorghum, Triticale, Dinkel, Leinsamen, Zuckerrohr, Raps, Kresse, Arabidopsis, Kohlarten, Soja, Alfalfa, Erbse, Bohnengewächsen, Erdnuß, Kartoffel, Tabak, Tomate, Aubergine, Paprika, Sonnenblume, Tagetes, Salat, Calendula, Melone, Kürbis und Zucchini.
20. Rekombinanter Organismus nach einem der Ansprüche 17 bis 19, wobei der Organismus eine Pflanze ist, die zusätzlich einen mlo-resistenten Phänotyp aufweist.

1/15

1

50

AtBI-1	(1)	-----MDAFSSFFDSQPGS---RSWSYDSLKNFRQISPAVQNH LKR
BnBI-1	(1)	-----MDSFSSFFDSQPGS---RSWSYDSLKNL RQISPSVQNH LKR
GmBI2	(1)	-----RLQAMDAFNSFFDS-----RNRWNYDTLKNFRQISPVVQNH LKQ
GmBI3	(1)	ITKTIRFDSLFSMDTFFKSPSSSSSRWSYDTLKNFREISPLVQNH IKL
HVBI-1	(1)	-----MDAFYSTS---SAAASGWGHDSLKNFRQISPAVQSH LKL
NtBI-1	(1)	-----MESCTSF FNSQSASS-RNRWSYDSLKNFRQISPFVQTH LKK
OsBI-1	(1)	-----MDAFYSTSSAYGAAASGWGYDSLKNFRQISPAVQSH LKL
TaBI11	(1)	-----
TaBI18	(1)	-----FSGTFRNSRSDDFVLCELQRELPCR DATLTV
TaBI5 neu	(1)	-----VAMPGR
ZmBI14	(1)	-----
ZmBI16	(1)	-----
ZmBI33	(1)	-----
ZmBI8	(1)	-----
Consensus	(1)	F S W YDSLKN R ISP VQ HLK

51

100

AtBI-1	(39)	VYLTLCALVASAFGAYLHVLWNIGGILTTIGCIGTMIWLLSCPPYEHQK
BnBI-1	(39)	VYLTLCALVASAFGAYLHVLWNIGGILTTIGCFGSMIWLLSCPPYEQK
GmBI2	(40)	VYFTLCFAVVAAAVGAYLHVLLNIGGFLT TVACMGSSFWLLSTPPFEERK
GmBI3	(51)	VYFTLCCAVVAAAVGAFLHVLWNIGGFLT TLASIGSMFWLLSTPPFEQK
HVBI-1	(37)	VYLTLCFALASSAVGAYLHIALNIGGMLTMLACVGTIAWMFVSPVYEERK
NtBI-1	(41)	VYLSLCCALVASAAGAYLHILWNIGGLLT LGCVGSIVWL MATPLYEEQK
OsBI-1	(40)	VYLTLCVALAASAVGAYLHVALNIGGMLTMLGCVGSI AWLFVSPVFEERK
TaBI11	(1)	-----
TaBI18	(33)	VYVIPIVGRIKSAAGAYLHIALNIGGMLTMLACIGTIAWMFVSPVYEERK
TaBI5 neu	(7)	RFRLTYALPGLICRGCLPAHCPEHWRDADNARVYRNHRLDVLGASLRGEE
ZmBI14	(1)	-----GSI AWLFVSPVYEERK
ZmBI16	(1)	-----WNIGVRLTMLGCSIDWLFVSPVYEERK
ZmBI33	(1)	-----WNIGGTLTMLGCVGSI AWLFVSPVYEERK
ZmBI8	(1)	-----
Consensus	(51)	VY TLC AL ASA GAYLHV NIGG LT LGCIGSI WL S PVYEERK

101

150

AtBI-1	(89)	RLSLLFVSAVLEGASVGPLIKVAIDVDPSILITAFVGT AIAFVCF SAAAM
BnBI-1	(89)	RLSLLFLSAVLEGASVGPLIKVAVD F DPSILITAFVGT AIAFICF SGAAM
GmBI2	(90)	RVTLLMAASLFQGS SIGPLIDLAIHIDPSLIFSAFVGTALAFACF SGAAL
GmBI3	(101)	RLSLLMASALFQGASIGPLIDLAF AIDPGLIIGAFVATSLAFACF SAVAL
HVBI-1	(87)	RFGLLMGAALLEGASVGPLIELAIDFDPSILVTGFVGT AIAFGCF SGAAI
NtBI-1	(91)	RIALLMAAALFKGASIGPLIELAIDFDPSIVIGAFVGC AFAFGCF SAAAM
OsBI-1	(90)	RFGILLAAALLEGASVGPLIKLAVDFDSSILVTAFVGT AIAFGCF TCAAI
TaBI11	(1)	-----AAI
TaBI18	(83)	RFGLLMGAALLEGASVGPLIELAIDFDPSILVTGFVGT AIAFGCF SGAAI
TaBI5 neu	(57)	EVWAADGCSLLEGASVGPLIELAIDFDPSILVTGFVGT AIAFGCF SGAAI
ZmBI14	(17)	RYWLLMAAALLEGASVGPLIKLAVEFDPSILVTAFVGT AIAFACF SCAAM
ZmBI16	(30)	RYGLLMAAALLEGASVGPLVKLAVEFDPSILVTAFVGT AIAFACF SGAAM
ZmBI33	(30)	RYGLLMAAALLEGASVGPLVKLAVEFDPSILVTAFVGT AIAFACF SGAPW
ZmBI8	(1)	-----VIDLDSRILVTAFVGTAVAFACF SGAAI
Consensus	(101)	R LLMAAALLEGASVGPLI LAIDFDPSILVTAFVGT AIAFACF SGAAI

Fig. 1a

08 SEP 2005

THIS PAGE BLANK (USPTO)

		151	200
AtBI-1	(139)	LARRREYLYLGGLLSSGLSMLMWLQFASSIFG-GSASIFKFEYFGLLIF	
BnBI-1	(139)	LARRREYLYLGGLLSSGLSMLMWLQFASSIFG-GSASIFKFEYFGLLIF	
GmBI2	(140)	VARRREYLYLGGLVSSGLSILLWLHFASSIFG-GSTALFKFEYFGLLVF	
GmBI3	(151)	VARRREYLYLGGLLSSWLSTILMWLHSDSSLFG-GSIALFKFEYFGLLVF	
HVBI-1	(137)	IAKRREYLYLGGLLSSGLSILLWLQFVTSIFGHSS-GSFMFEVYFGLLIF	
NtBI-1	(141)	VARRREYLYLGGLLSSGLSILFWLHFASSIFG-GSMALFKFEVYFGLLVF	
OsBI-1	(140)	VAKRREYLYLGGLLSSGLSILLWLQFAASIFGHST-GSFMFEVYFGLLIF	
TaBI11	(4)	IAKRREYLYLGGLLSSGLSILLWLQFATSIFGHSS-GSFMFEVYFGLLIF	
TaBI18	(133)	IAKRREYLYLGGLLSSG-----LTIL	
TaBI5 neu	(107)	IAKRREYLYLGGLLSSGLSILLWLQFATSIFGHSS-GSFMFEVYFGLLIF	
ZmBI14	(67)	VAKRREYLYLGGLLSSGLSILLWLQFAASIFGHQSTSSFMFEVYFGLLIF	
ZmBI16	(80)	VARRREYLYLGGLLSSGLSILLWLQLAASIF-GHSATSFMFVYFGLLIF	
ZmBI33	(80)	WQAR-EYLYLGCSRSGSPSCSGCSSPPSS--ALRNSFMFEVYFGLLIL	
ZmBI8	(29)	IAKRREYLYLGGLLSSGLSILLWLQFATSIFGHTS-ATFMFEYFGLLVF	
Consensus	(151)	VAKRREYLYLGGLLSSGLSILLWLQFASSIFG S ASFMFEVYFGLLIF	
		201	250
AtBI-1	(188)	VGVMVVDTQEIIIEKAHLGDMYVVKHSLTLFTDFVAVFVRILIIMLKNSAD	
BnBI-1	(188)	VGVMVVDTQDIIEKAHLGDMYVVKHSLTLFTDFVAVFVRVLIIMLKNSAD	
GmBI2	(189)	VGIVVDTQEIVERAHLGDLDYVKHALTLFTDLVAVFVRILVIMLKNSTE	
GmBI3	(200)	VGIVVDTQEIIERAHFGDLDYVKHALTLFTDLAAIFVRILIIMLKNSSE	
HVBI-1	(186)	LGVMVYDTQEIIERAHHGDMYIKHALTLFTDFVAVLVRVLIIMLKNAAGD	
NtBI-1	(190)	VGIIIFDTQDIIEKAHLGDLDYVKHALTLFTDFVAVFVRILIIMLKNASD	
OsBI-1	(189)	LGVMVYDTQEIIERAHHGDMYIKHALTLFTDFVAVLVRILVIMLKNASD	
TaBI11	(53)	LGVMVYDTQEIIERAHHGDMYIKHALTLFTDFVAVLVRILIIMLKNAAGD	
TaBI18	(154)	L-----	
TaBI5 neu	(156)	LGVMVYDTQEIIERAHHGDMYIKHALTLFTDFVAVLVRVLIILLKNAAD	
ZmBI14	(117)	LGVMVYDTQEVIERAHHG-----	
ZmBI16	(129)	LGVMVYDT-----	
ZmBI33	(127)	LG-----	
ZmBI8	(78)	LGVMVYDTQEIIERAHRGDMYIKHALTLFTDFVAVLVRILVIMMKNAQE	
Consensus	(201)	LGVMVYDTQEIIERAH GDMYIKHALTLFTDFVAV VRILIIMLKNA D	
		251	300
AtBI-1	(238)	KEEKKKKRRN-----GDVK-I-LYGCYRVWPL-RYLLALSIGDQTCF	
BnBI-1	(238)	KEDKKKKRRN-----D-KVRKKAK-SGCYVCFFK-----KRVG	
GmBI2	(239)	RNEKKKKRRD-----	
GmBI3	(250)	RNEKKKKRRD--ADRPTRAQASLQ-FSLWRIHN-----LFR-CWSLV-	
HVBI-1	(236)	KSEDKKKKRKR-----S-----	
NtBI-1	(240)	KEEKKKKRRN----CISGYSKTL-L-NLAFSCS---TSVDLRQVCC--FG	
OsBI-1	(239)	KSEEKKKKRRS-ELLFPLCT-EKTTAAIASTYYDRAALQLGFMVNTSSFA	
TaBI11	(103)	KSEDKKKKRKR-----	
TaBI18	(155)	-----	
TaBI5 neu	(206)	KVGGQEEEEEEKS-----	
ZmBI14	(135)	-----	
ZmBI16	(137)	-----	
ZmBI33	(129)	-----	
ZmBI8	(128)	KSQDEKKRK-----	
Consensus	(251)	K E KKKRR	

Fig. 1b

USPTO 08 SEP 2005

THIS PAGE BLANK (USPTO)



```

                                301                                350
AtBI-1 (278) H-KG-SACFTSAQVPSSDCK-----LECCSSFHKLLEFFKSL
BnBI-1 (269) VISTDMIALVFFTCLEQFW-----QHTLRICVFLLVTPDCEWI
GmBI2 (249) -----
GmBI3 (288) LVSYVFAVMVNVRI SFKHLHMYLPIS-CVV-HHTLV-KKKKKKKKKKKKK
HVBI-1 (248) -----
NtBI-1 (279) NASD-AARLCYAAACQCGYGGT-MVLF----PKHTIK-HACLHYIDNLRVY
OsBI-1 (287) FC-YGVNLLRFVVVVALQILACYMTRIFL-WWSR-SKRENTSSFATNLFA
Consensus (301)

```

```

                                351                                400
AtBI-1 (312) VLLIASYQAKNNVGK-----SCLNFLKCVHFRRKKKKKKKKKK-----
BnBI-1 (307) SILKLC-KLSVGS-----
GmBI2 (249) -----
GmBI3 (335) KKKKKXXXXXXXXXXXXXX--XXXXXGVCGLRYSRHSSNH-EGSLW-PGLC-
HVBI-1 (248) -----
NtBI-1 (322) YLFLLPFAVLGCS-LYS-FSVMLDHLLS-RLISHIDGRNENSHRRPNLFFK
OsBI-1 (334) FW-LMMILSPKKKK-----
Consensus (351)

```

```

                                401                                450
AtBI-1 (348) -----
BnBI-1 (319) -----
GmBI2 (249) -----
GmBI3 (380) ACIDTVH-FGCNLCANS-YNVE-FI-EK-EEEEERLIG-PIAMCRVIWV
HVBI-1 (248) -----
NtBI-1 (369) TEAQL-----
Consensus (401)

```

```

                                451                                500
GmBI3 (424) ENT-LAV-KLLVPLCS--LAMCLL-W-MSGFLLNIFICIC--S-YIV-TS
Consensus (451)

```

```

                                501                                512
GmBI3 (464) FLGLKKEKKKKK
Consensus (501)

```

Fig.1c

JC14 Rec'd PCT/PTO 08 SEP 2005

THIS PAGE BLANK (USPTO)

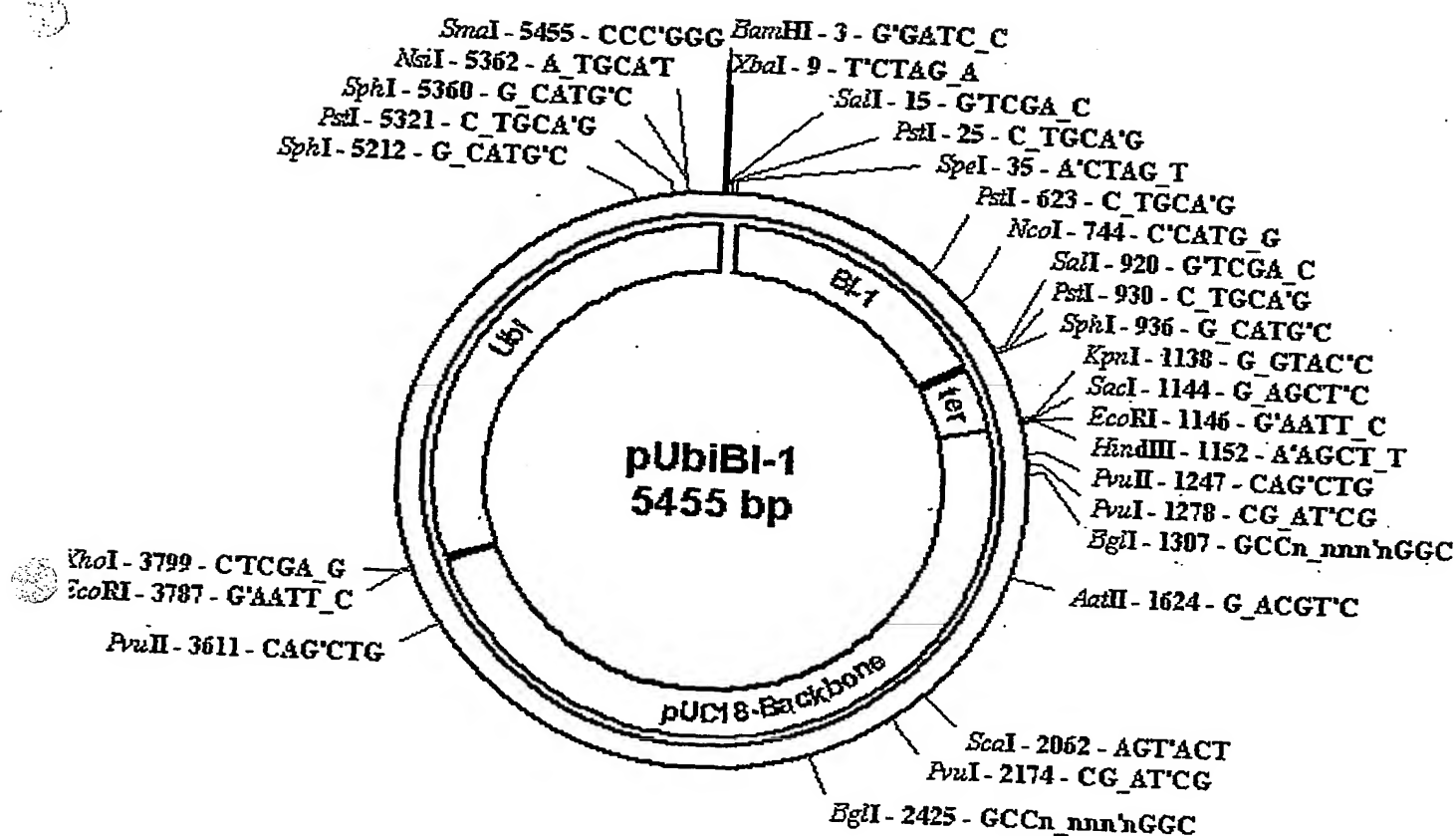


Fig.2

RECEIVED JUL 15 08 31 2005

THIS PAGE BLANK (USPTO)

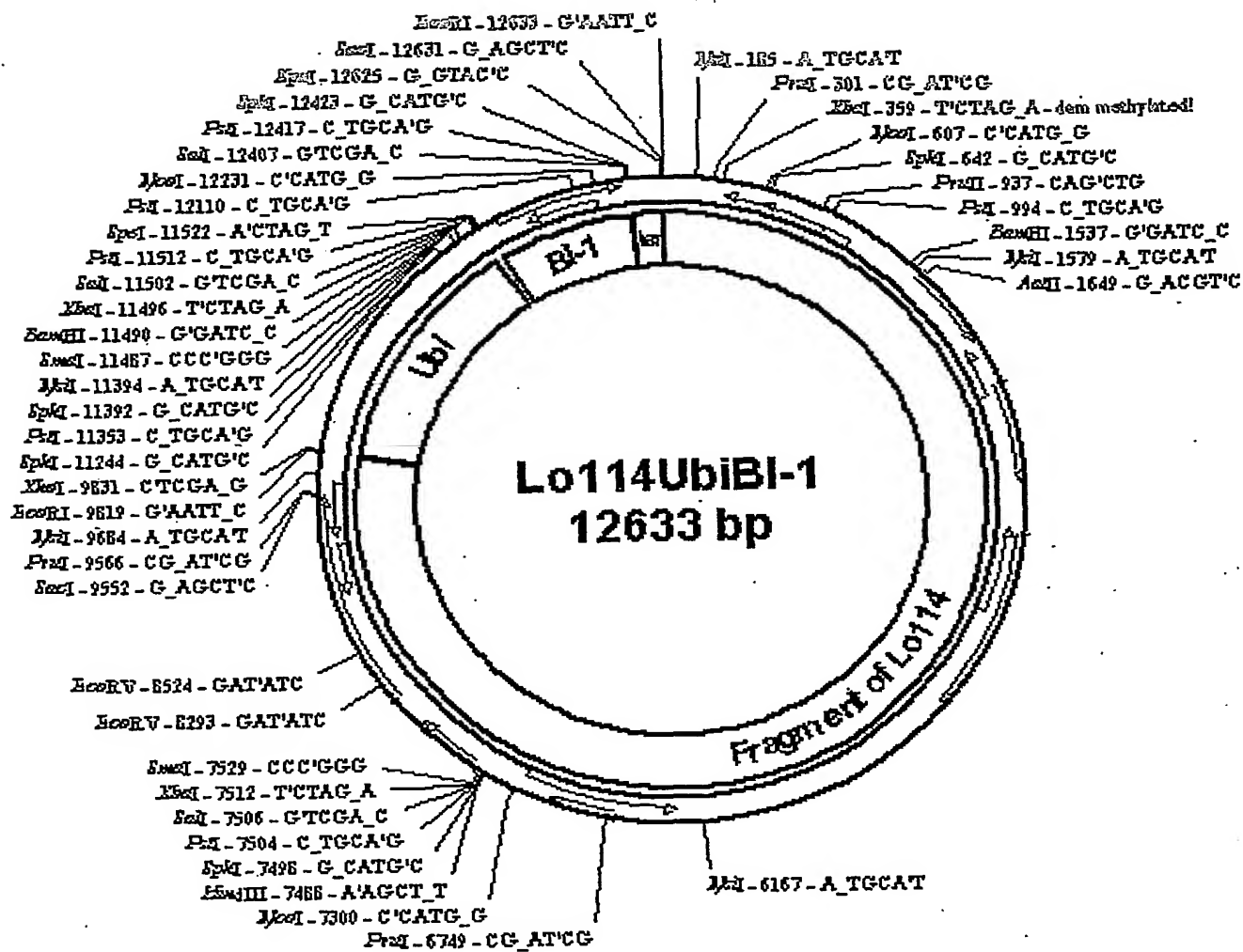


Fig. 3

JUL 4 10 41 AM '05  
JUL 4 10 41 AM '05 08 SEP 2005

THIS PAGE BLANK (USPTO)

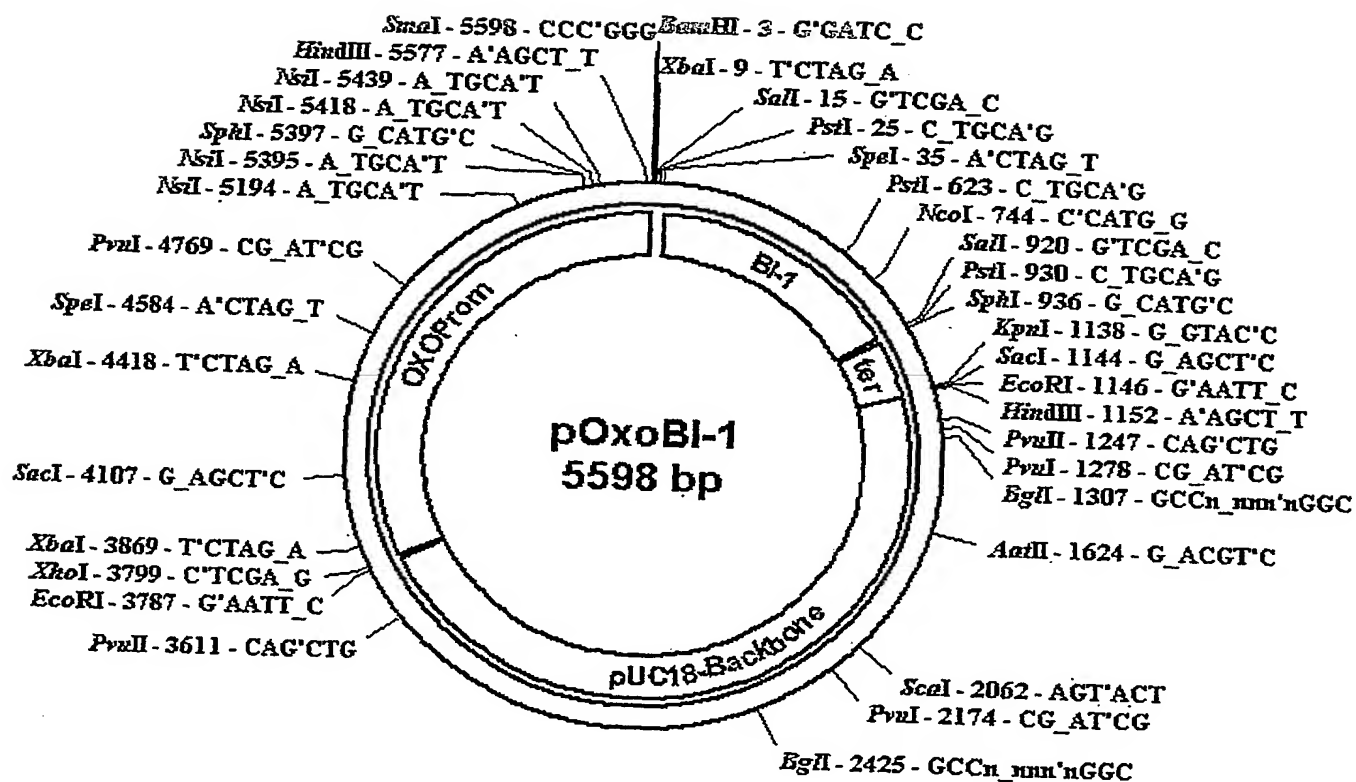


Fig. 4

JC14 Rec'd CT/PTO 08 SEP 2005

THIS PAGE BLANK (USPTO)



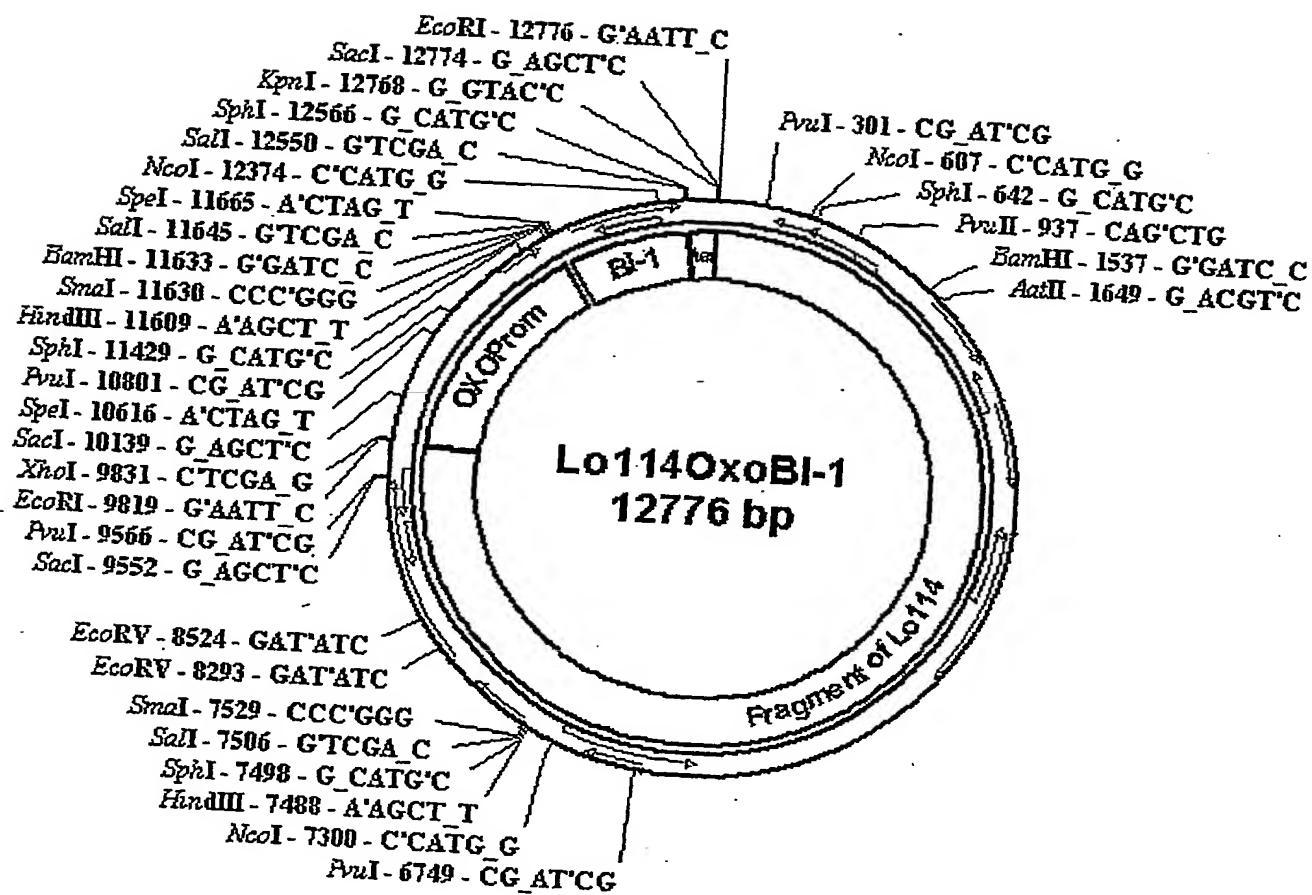


Fig. 5

RECEIVED 19 FEB 2005

THIS PAGE BLANK (USPTO)

*H. vul.* MDQVSTSS---AAASGCHGDSHREKRCISPAVESHRLNGLTLCFALASSAVGQTHLA 57  
*O. sat.* MDQVSTSSAYGAAASGCHGDSHREKRCISPAVESHRLNGLTLCFALASSAVGQTHLA 60  
*A. tha.* MDQVSTSSAYGAAASGCHGDSHREKRCISPAVESHRLNGLTLCFALASSAVGQTHLA 59  
*H. sap.* MNIEDRKIN-----FLALKESHITESTQCHLRVYASFALCHFVAADGAVHNV 50

*H. vul.* LN--IGGCLIMLACVGTIAHFSVPVYEE--RKRFGLLMGALLEGASVGPLIELAIDFD 113  
*O. sat.* LN--IGGCLIMLACVGTIAHFSVPVYEE--RKRFGILLALLEGASVGPLIELAIDFD 116  
*A. tha.* LN--IGGCLIMLACVGTIAHFSVPVYEE--RKRFGILLALLEGASVGPLIELAIDFD 115  
*H. sap.* THFIQAGILSALGSLILMIULHATPHSHETEOKRLGLLAGFELITGVGLGPALEFCIEVN 110

*H. vul.* PSILVITGFGTMAIFGCFSCAIIIEKRRREYLYLGGLSSGLSILLMLQFVTSIFGHSSGS 173  
*O. sat.* SSILVITGFGTMAIFGCFSCAIIIEKRRREYLYLGGLSSGLSILLMLQFVTSIFGHSSGS 176  
*A. tha.* PSILVITGFGTMAIFGCFSCAIIIEKRRREYLYLGGLSSGLSILLMLQFVTSIFGHSSGS 175  
*H. sap.* PSILPTAFMGTAHIFTCETLSALYARRESYFLGGLILMSALSLLLLSSLGNVFFG-SIUP 169

*H. vul.* FMFEVVFGLLIFLGYWYDTCETIEPAHHCDDYIEKHALTLFTDFVAVLVRIILVINEKMA 233  
*O. sat.* FMFEVVFGLLIFLGYWYDTCETIEPAHHCDDYIEKHALTLFTDFVAVLVRIILVINEKMA 236  
*A. tha.* FMFEVVFGLLIFLGYWYDTCETIEPAHHCDDYIEKHALTLFTDFVAVLVRIILVINEKMA 235  
*H. sap.* FOANLYVGLVVMCGFVLVDTCETIEPAHHCDDYIEKHALTLFTDFVAVLVRIILVINEKMA 229

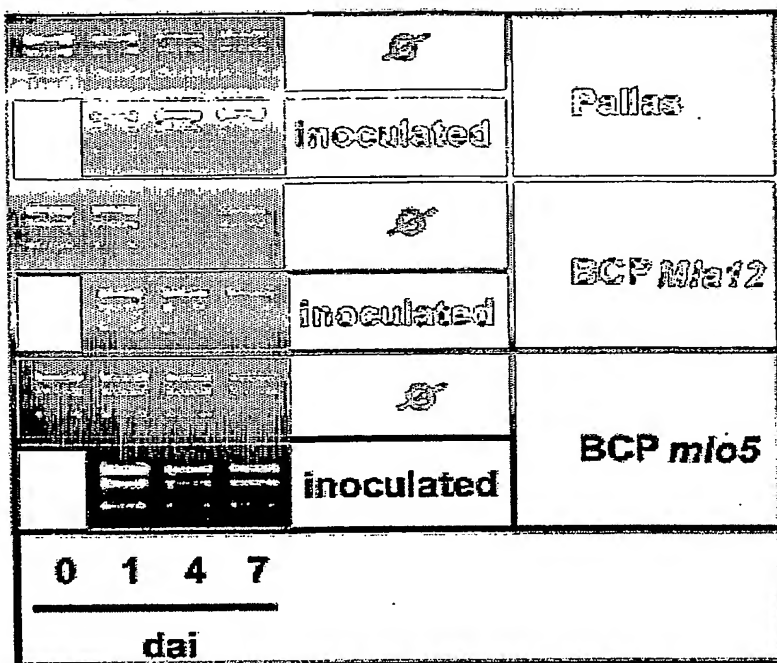
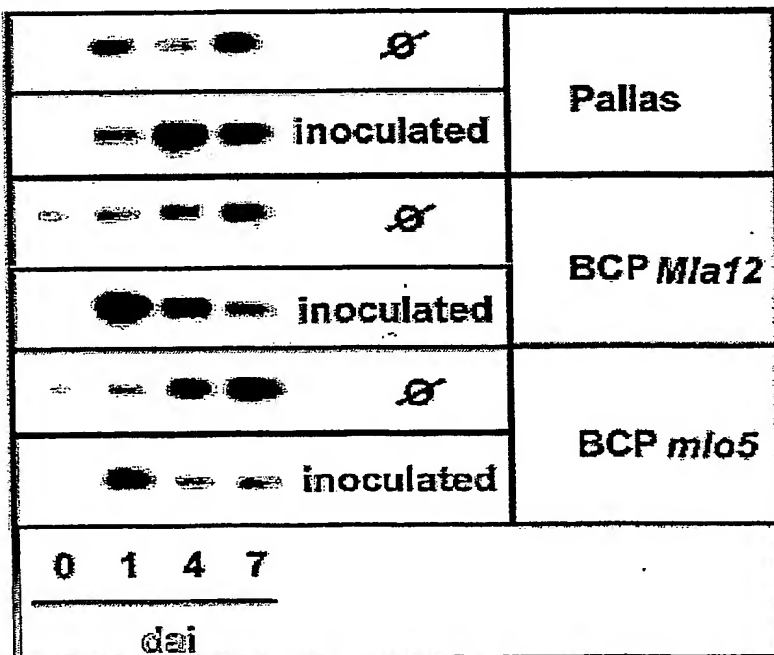
*H. vul.* GDRSEDKRRKRKRS 247  
*O. sat.* SDRSEKRRKRKRS- 249  
*A. tha.* ADR-EEKKKKRRN- 247  
*H. sap.* KDR---KREKK--- 237

Fig. 6

2004 RECEIVED 08 SEP 2005

THIS PAGE BLANK (USPTO)

9/15

**rRNAs****BI-1****Fig. 7**

JC14 Re PCT/PTO 08 SEP 2005

THIS PAGE BLANK (USPTO)

10/15

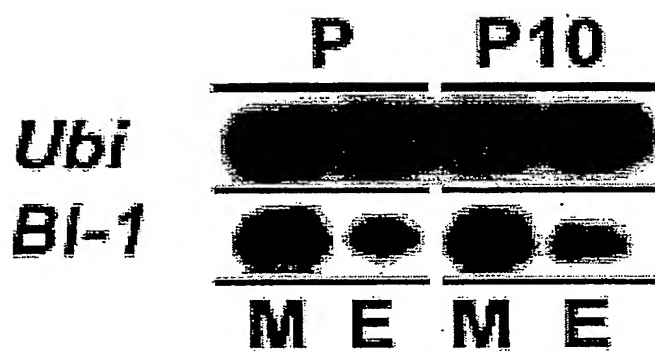


Fig. 8

107 107 107 08 SEP 2005

THIS PAGE BLANK (USPTO)



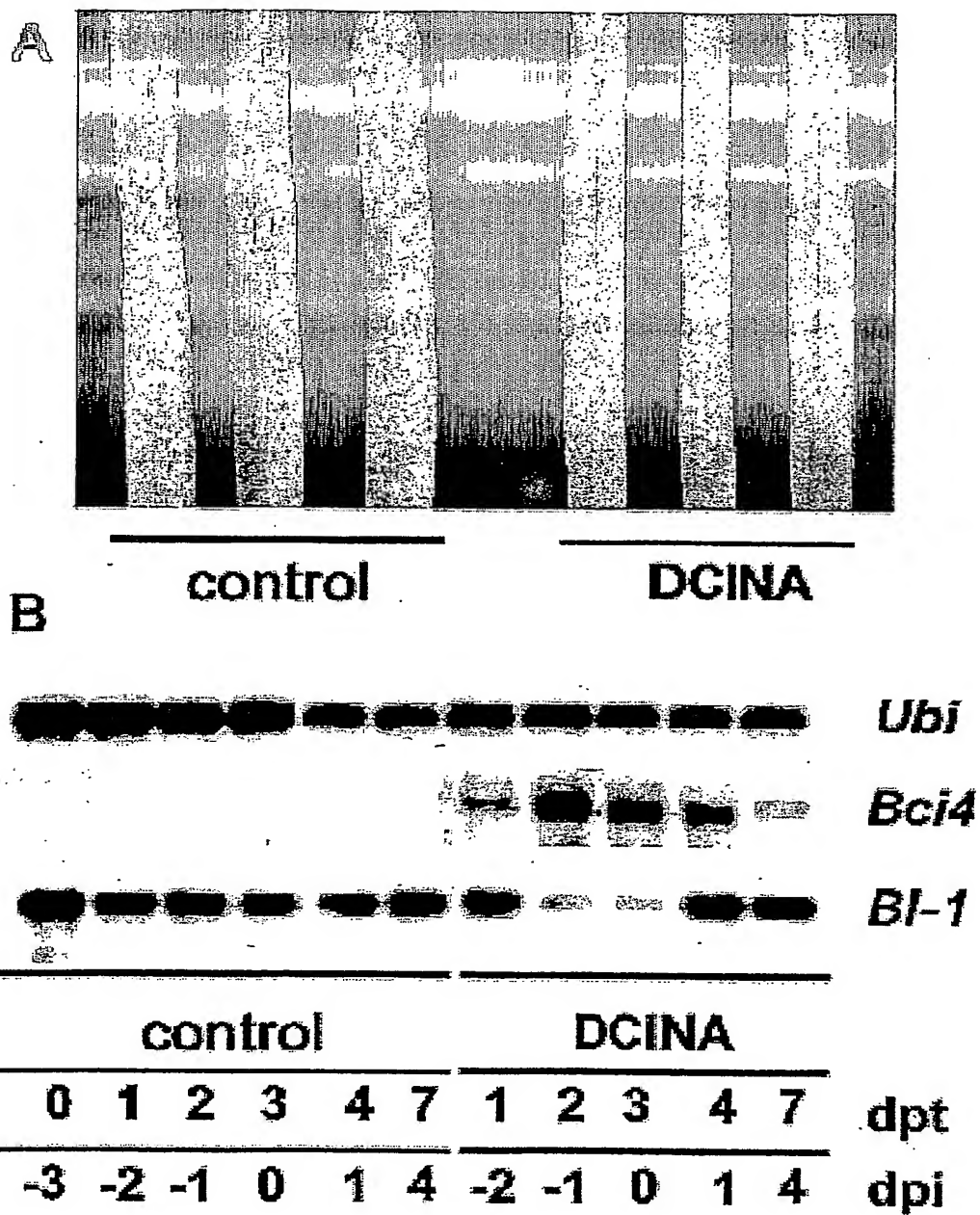


Fig. 9

JC14 Recd PGI/PTO 08 SEP 2005

THIS PAGE BLANK (USPTO)

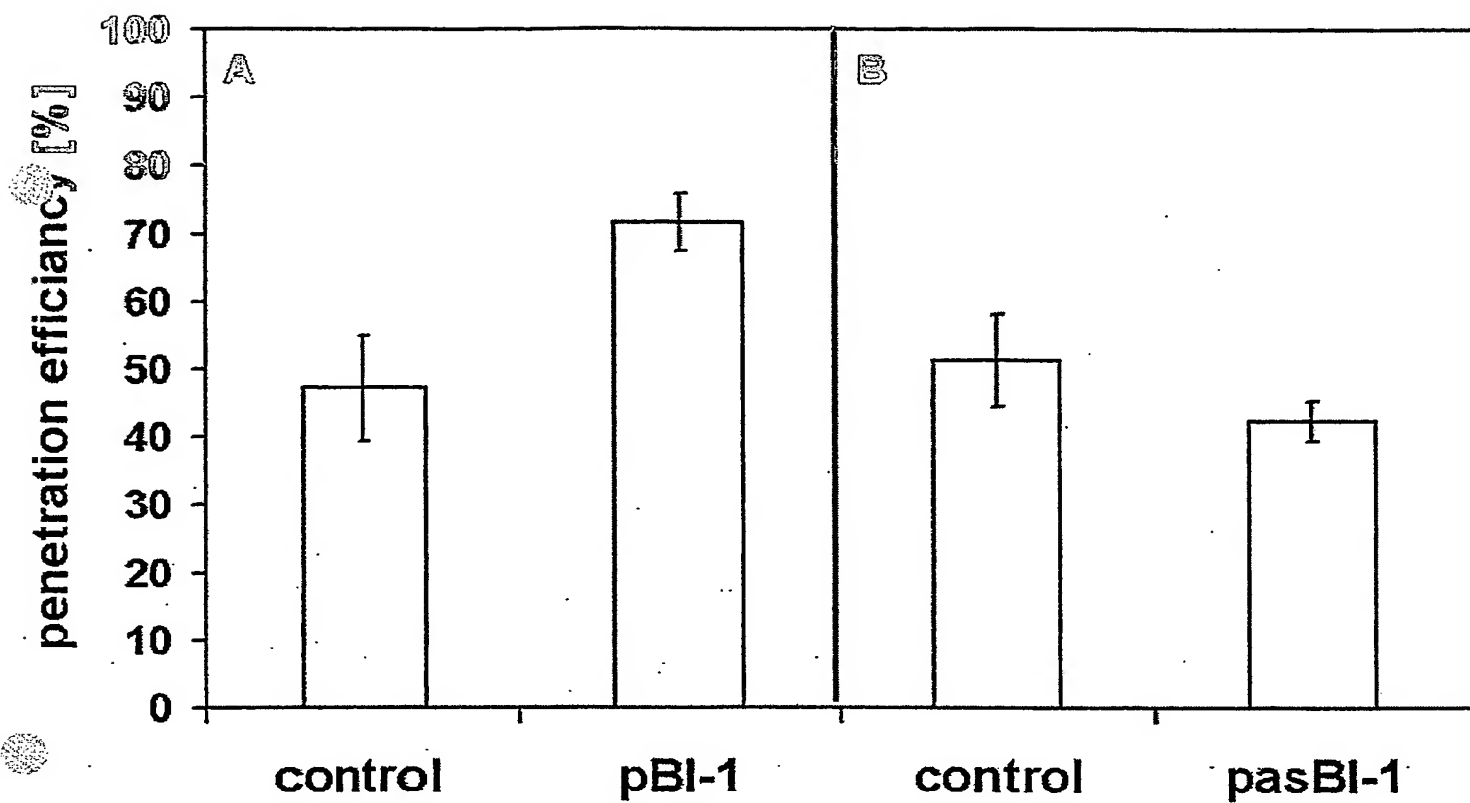


Fig.10

THIS PAGE BLANK (USPTO)

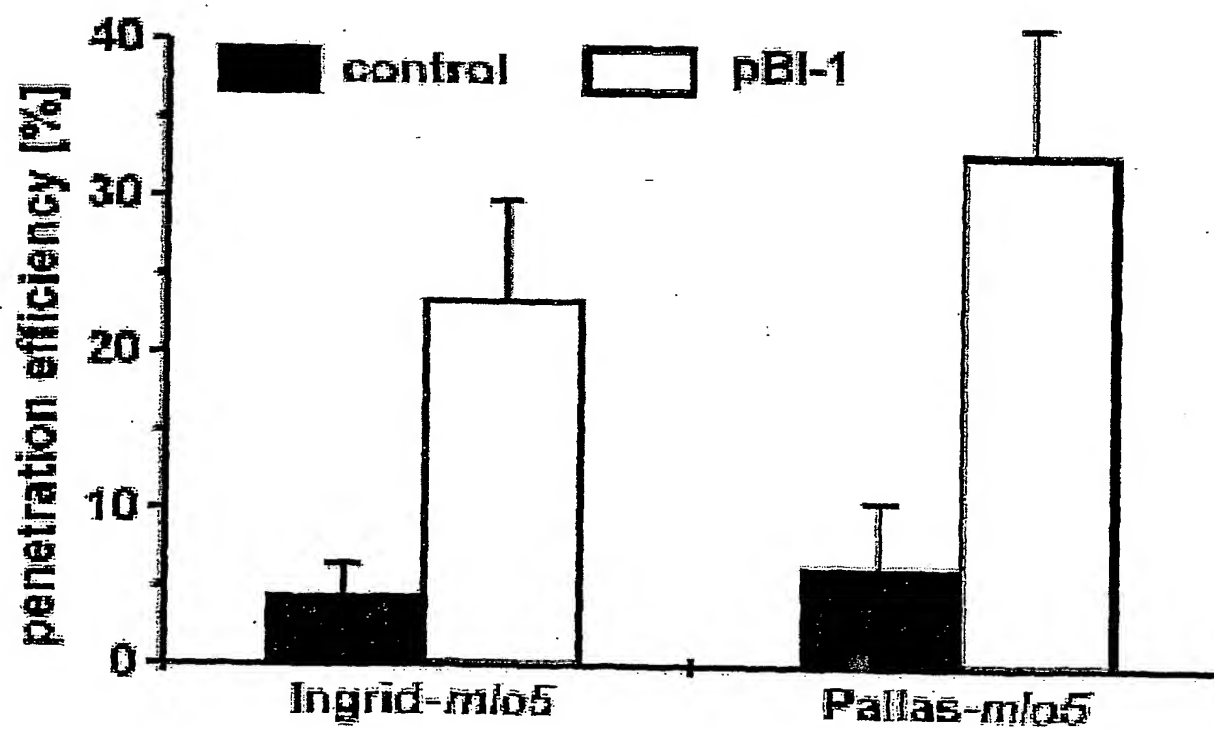


Fig. 11

08 SEP 2005

THIS PAGE BLANK (USPTO)

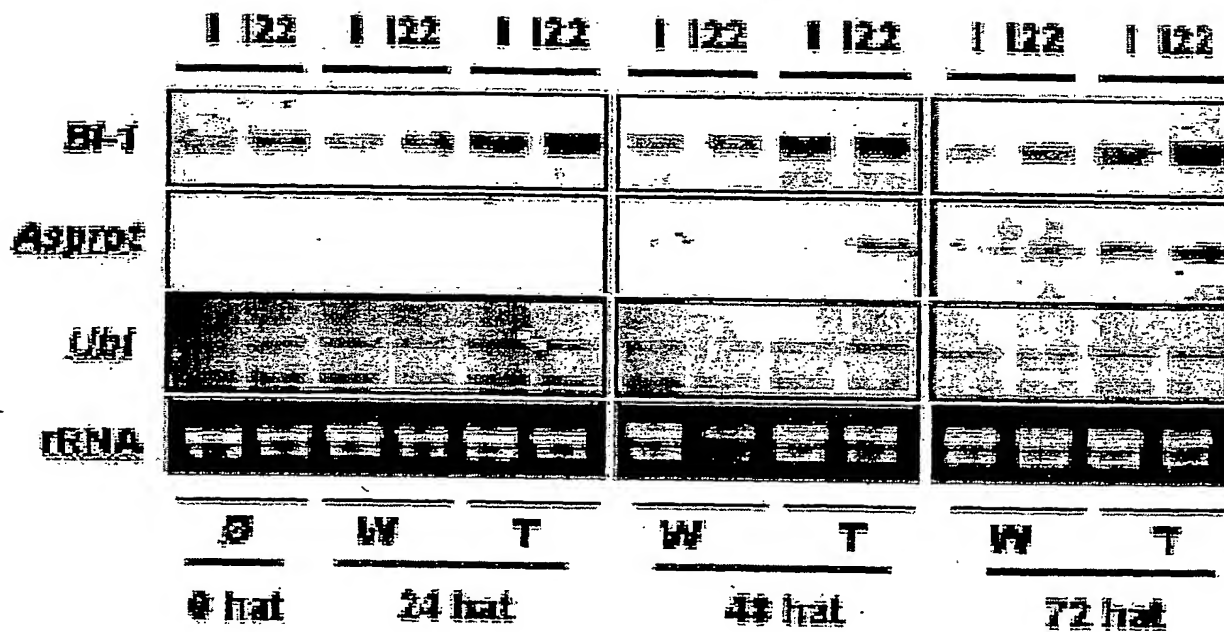


Fig.12

JCFM Rec'd 08 SEP 2005

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



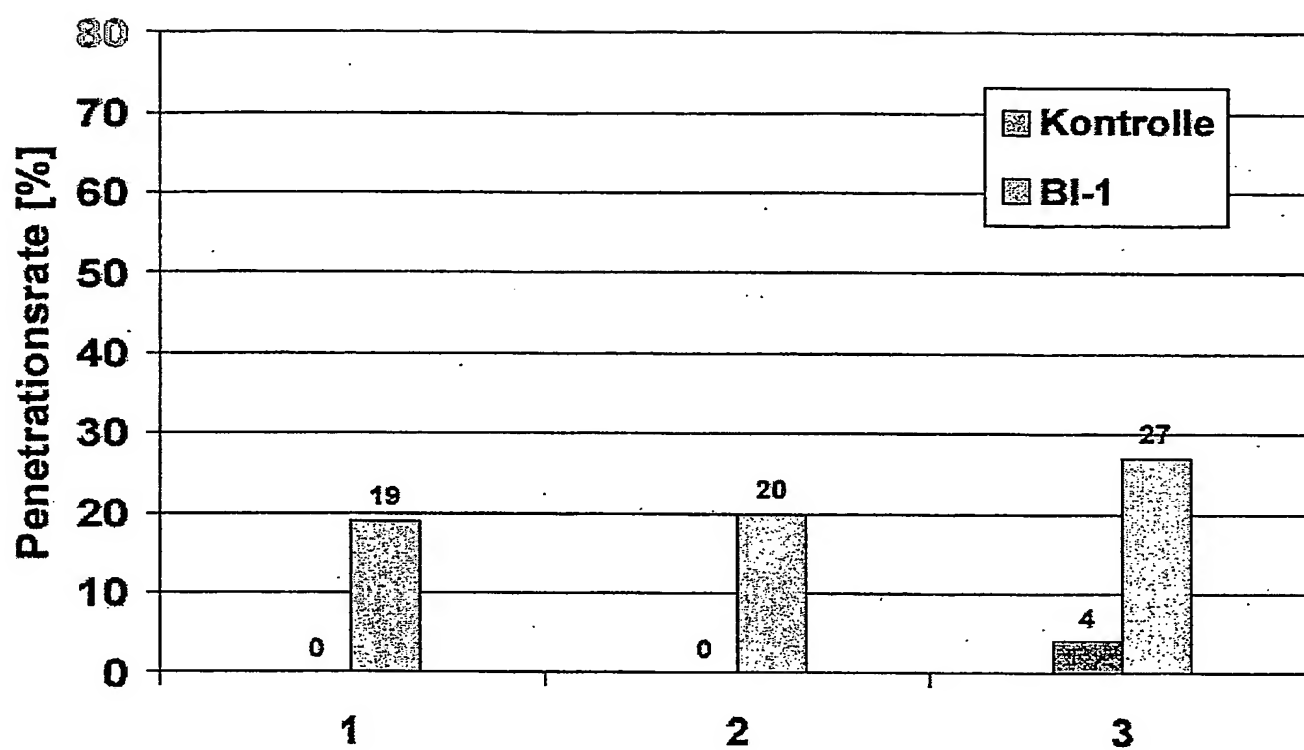


Fig.13

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## SEQUENZPROTOKOLL

<110> BASF Plant Science GmbH

5 <120> Verfahren zur Erhöhung der Resistenz gegen  
Streßfaktoren in Pflanzen

<130> PF54350-AT

10 <140>  
<141>

<160> 44

15 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1  
<211> 744  
<212> DNA

20 <213> Hordeum vulgare

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(741)

25 <223> coding for BII-protein

<400> 1

30	atg gac gcc ttc tac tgc acc tgc tgc gcg gcg gcg agc ggc tgg ggc	48
	Met Asp Ala Phe Tyr Ser Thr Ser Ser Ala Ala Ala Ser Gly Trp Gly	
	1 5 10 15	
	cac gac tcc ctc aag aac ttc cgc cag atc tcc ccc gcc gtg cag tcc	96
	His Asp Ser Leu Lys Asn Phe Arg Gln Ile Ser Pro Ala Val Gln Ser	
	20 25 30	
35	cac ctc aag ctc gtt tac ctg act cta tgc ttt gca ctg gcc tca tct	144
	His Leu Lys Leu Val Tyr Leu Thr Leu Cys Phe Ala Leu Ala Ser Ser	
	35 40 45	
40	gcc gtg ggt gct tac cta cac att gcc ctg aac atc ggc ggg atg ctg	192
	Ala Val Gly Ala Tyr Leu His Ile Ala Leu Asn Ile Gly Gly Met Leu	
	50 55 60	
45	aca atg ctc gct tgt gtc gga act atc gcc tgg atg ttc tgc gtg cca	240
	Thr Met Leu Ala Cys Val Gly Thr Ile Ala Trp Met Phe Ser Val Pro	
	65 70 75 80	
50	gtc tat gag gag agg aag agg ttt ggg ctg ctg atg ggt gca gcc ctc	288
	Val Tyr Glu Glu Arg Lys Arg Phe Gly Leu Leu Met Gly Ala Ala Leu	
	85 90 95	
	ctg gaa ggg gct tgc gtt gga cct ctg att gag ctt gcc ata gac ttt	336
	Leu Glu Gly Ala Ser Val Gly Pro Leu Ile Glu Leu Ala Ile Asp Phe	
	100 105 110	
55	gac cca agc atc ctc gtg aca ggg ttt gtc gga acc gcc atc gcc ttt	384
	Asp Pro Ser Ile Leu Val Thr Gly Phe Val Gly Thr Ala Ile Ala Phe	
	115 120 125	
60	ggg tgc ttc tct ggc gcc gcc atc atc gcc aag cgc agg gag tac ctg	432
	Gly Cys Phe Ser Gly Ala Ala Ile Ile Ala Lys Arg Arg Glu Tyr Leu	
	130 135 140	
65	tac ctc ggt ggc ctg ctc tgc tct ggc ctg tgc atc ctg ctc tgg ctg	480
	Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser Gly Leu Ser Ile Leu Leu Trp Leu	
	145 150 155 160	
70	cag ttt gtc acg tcc atc ttt ggc cac tcc tct ggc agc ttc atg ttt	528
	Gln Phe Val Thr Ser Ile Phe Gly His Ser Ser Gly Ser Phe Met Phe	
	165 170 175	
	gag gtt tac ttt ggc ctg ttg atc ttc ctg ggg tac atg gtg tac gac	576
	Glu Val Tyr Phe Gly Leu Leu Ile Phe Leu Gly Tyr Met Val Tyr Asp	

	180	185	190	
5	acg cag gag atc atc gag agg gcg cac cat ggc gac atg gac tac atc Thr Gln Glu Ile Ile Glu Arg Ala His His Gly Asp Met Asp Tyr Ile 195 200 205	624		
10	aag cac gcc ctc acc ctc ttc acc gac ttt gtt gcc gtc ctc gtc cga Lys His Ala Leu Thr Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala Val Leu Val Arg 210 215 220	672		
15	gtc ctc atc atc atg ctc aag aac gca ggc gac aag tcg gag gac aag Val Leu Ile Ile Met Leu Lys Asn Ala Gly Asp Lys Ser Glu Asp Lys 225 230 235 240	720		
20	aag aag agg aag agg ggg tcc tga Lys Lys Arg Lys Arg Gly Ser 245	744		
25	<210> 2 <211> 247 <212> PRT <213> Hordeum vulgare			
30	Met Asp Ala Phe Tyr Ser Thr Ser Ser Ala Ala Ala Ser Gly Trp Gly 1 5 10 15			
35	His Asp Ser Leu Lys Asn Phe Arg Gln Ile Ser Pro Ala Val Gln Ser 20 25 30			
40	His Leu Lys Leu Val Tyr Leu Thr Leu Cys Phe Ala Leu Ala Ser Ser 35 40 45			
45	Ala Val Gly Ala Tyr Leu His Ile Ala Leu Asn Ile Gly Gly Met Leu 50 55 60			
50	Thr Met Leu Ala Cys Val Gly Thr Ile Ala Trp Met Phe Ser Val Pro 65 70 75 80			
55	Val Tyr Glu Glu Arg Lys Arg Phe Gly Leu Leu Met Gly Ala Ala Leu 85 90 95			
60	Leu Glu Gly Ala Ser Val Gly Pro Leu Ile Glu Leu Ala Ile Asp Phe 100 105 110			
65	Asp Pro Ser Ile Leu Val Thr Gly Phe Val Gly Thr Ala Ile Ala Phe 115 120 125			
70	Gly Cys Phe Ser Gly Ala Ala Ile Ile Ala Lys Arg Arg Glu Tyr Leu 130 135 140			
75	Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser Gly Leu Ser Ile Leu Leu Trp Leu 145 150 155 160			
80	Gln Phe Val Thr Ser Ile Phe Gly His Ser Ser Gly Ser Phe Met Phe 165 170 175			
85	Glu Val Tyr Phe Gly Leu Leu Ile Phe Leu Gly Tyr Met Val Tyr Asp 180 185 190			
90	Thr Gln Glu Ile Ile Glu Arg Ala His His Gly Asp Met Asp Tyr Ile 195 200 205			
95	Lys His Ala Leu Thr Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala Val Leu Val Arg 210 215 220			
100	Val Leu Ile Ile Met Leu Lys Asn Ala Gly Asp Lys Ser Glu Asp Lys 225 230 235 240			
105	Lys Lys Arg Lys Arg Gly Ser 245			

<210> 3  
 <211> 1067  
 5 <212> DNA  
 <213> *Arabidopsis thaliana*  
  
 <220>  
 <221> CDS  
 10 <222> (1)..(741)  
 <223> coding for B11-protein  
  
 <400> 3  
 15 atg gat gcg ttc tct tcc ttc ttc gat tct caa cct ggt agc aga agc 48  
 Met Asp Ala Phe Ser Ser Phe Phe Asp Ser Gln Pro Gly Ser Arg Ser  
 1 5 10 15  
  
 tgg agc tat gat tct ctt aaa aac ttc cgt cag att tct cca gcc gtt 96  
 Trp Ser Tyr Asp Ser Leu Lys Asn Phe Arg Gln Ile Ser Pro Ala Val  
 20 20 25 30  
  
 cag aat cat ctt aaa cgg gtt tat ttg acc tta tgt tgt gct ctt gtg 144  
 Gln Asn His Leu Lys Arg Val Tyr Leu Thr Leu Cys Cys Ala Leu Val  
 25 35 40 45  
  
 gcg tct gcc ttt gga gct tac ctc cat gtg ctc tgg aat atc ggc ggt 192  
 Ala Ser Ala Phe Gly Ala Tyr Leu His Val Leu Trp Asn Ile Gly Gly  
 50 55 60  
  
 30 att ctt aca acg att gga tgt att gga act atg att tgg ctc ctt tca 240  
 Ile Leu Thr Thr Ile Gly Cys Ile Gly Thr Met Ile Trp Leu Leu Ser  
 65 70 75 80  
  
 35 tgt cct cct tat gaa cac caa aaa agg ctt tct ctt ctg ttt gtg tct 288  
 Cys Pro Pro Tyr Glu His Gln Lys Arg Leu Ser Leu Leu Phe Val Ser  
 85 90 95  
  
 gct gtt ctt gaa ggt gct tct gtt ggc ccc ttg atc aaa gtg gca att 336  
 Ala Val Leu Glu Gly Ala Ser Val Gly Pro Leu Ile Lys Val Ala Ile  
 40 100 105 110  
  
 gat gtt gac cca agc atc ctt atc act gca ttt gtt gga act gcg ata 384  
 Asp Val Asp Pro Ser Ile Leu Ile Thr Ala Phe Val Gly Thr Ala Ile  
 45 115 120 125  
  
 gcg ttt gtc tgt ttc tca gca gca gca atg tta gca aga cgc agg gag 432  
 Ala Phe Val Cys Phe Ser Ala Ala Ala Met Leu Ala Arg Arg Arg Glu  
 130 135 140  
  
 50 tat ctc tac ctt gga gga ctg ctt tca tct ggc ttg tct atg cta atg 480  
 Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser Gly Leu Ser Met Leu Met  
 145 150 155 160  
  
 tgg ctc cag ttt gcc tct tca atc ttt ggt ggc tct gca tct atc ttt 528  
 Trp Leu Gln Phe Ala Ser Ser Ile Phe Gly Gly Ser Ala Ser Ile Phe  
 55 165 170 175  
  
 aag ttt gag ttg tac ttt gga ctt ttg atc ttt gtg gga tac atg gtg 576  
 Lys Phe Glu Leu Tyr Phe Gly Leu Leu Ile Phe Val Gly Tyr Met Val  
 60 180 185 190  
  
 gtg gac aca caa gag att ata gaa aag gca cac ctc ggt gac atg gac 624  
 Val Asp Thr Gln Glu Ile Ile Glu Lys Ala His Leu Gly Asp Met Asp  
 65 195 200 205  
  
 tat gta aaa cat tcg ttg acc ctt ttc act gac ttt gta gct gtg ttt 672  
 Tyr Val Lys His Ser Leu Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala Val Phe  
 70 210 215 220  
  
 gtt cgg att ctc atc ata atg ttg aag aac tca gca gat aaa gaa gag 720  
 Val Arg Ile Leu Ile Ile Met Leu Lys Asn Ser Ala Asp Lys Glu Glu  
 225 230 235 240

aag aag aag aaa agg aga aac tgaggggatg taaagtaaata ttaactttat 771  
 Lys Lys Lys Lys Arg Arg Asn  
 245

5 ggttggttatc gtgtgtggcc actttgaaga tattacttgt tagcactctc tattggtgac 831  
 cagacatggt tccactaaaa aggatctgct tgtttcactt ctgcacaagt accatcttca 891  
 gattgtaaata gactcgagtg ttgtttcttct tttcataaac ttttggttctt taagagtttg 951  
 10 gttctactga ttgcatctta ccaagctaag aataatgtag gaaaatgata atcctgttta 1011  
 aattttctaa aatgtgtgca tttcagaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa 1067

15 <210> 4  
 <211> 247  
 <212> PRT  
 <213> Arabidopsis thaliana

20 <400> 4  
 Met Asp Ala Phe Ser Ser Phe Phe Asp Ser Gln Pro Gly Ser Arg Ser  
 1 5 10 15

25 Trp Ser Tyr Asp Ser Leu Lys Asn Phe Arg Gln Ile Ser Pro Ala Val  
 20 25 30  
 Gln Asn His Leu Lys Arg Val Tyr Leu Thr Leu Cys Cys Ala Leu Val  
 35 40 45

30 Ala Ser Ala Phe Gly Ala Tyr Leu His Val Leu Trp Asn Ile Gly Gly  
 50 55 60

35 Ile Leu Thr Thr Ile Gly Cys Ile Gly Thr Met Ile Trp Leu Leu Ser  
 65 70 75 80  
 Cys Pro Pro Tyr Glu His Gln Lys Arg Leu Ser Leu Leu Phe Val Ser  
 85 90 95

40 Ala Val Leu Glu Gly Ala Ser Val Gly Pro Leu Ile Lys Val Ala Ile  
 100 105 110  
 Asp Val Asp Pro Ser Ile Leu Ile Thr Ala Phe Val Gly Thr Ala Ile  
 115 120 125

45 Ala Phe Val Cys Phe Ser Ala Ala Ala Met Leu Ala Arg Arg Arg Glu  
 130 135 140

50 Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser Gly Leu Ser Met Leu Met  
 145 150 155 160  
 Trp Leu Gln Phe Ala Ser Ser Ile Phe Gly Gly Ser Ala Ser Ile Phe  
 165 170 175

55 Lys Phe Glu Leu Tyr Phe Gly Leu Leu Ile Phe Val Gly Tyr Met Val  
 180 185 190  
 Val Asp Thr Gln Glu Ile Ile Glu Lys Ala His Leu Gly Asp Met Asp  
 195 200 205

60 Tyr Val Lys His Ser Leu Thr Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala Val Phe  
 210 215 220

65 Val Arg Ile Leu Ile Ile Met Leu Lys Asn Ser Ala Asp Lys Glu Glu  
 225 230 235 240  
 Lys Lys Lys Lys Arg Arg Asn  
 245

70 <210> 5  
 <211> 1160

<212> DNA  
 <213> Nicotiana tabacum

5 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(747)  
 <223> coding for BII-protein

<400> 5  
 10 atg gag tct tgc aca tcg ttc ttc aat tca cag tcg gcg tcg tct cgc 48  
 Met Glu Ser Cys Thr Ser Phe Phe Asn Ser Gln Ser Ala Ser Ser Arg  
 1 5 10 15  
 15 aat cgc tgg agt tac gat tct ctt aag aac ttc cgc cag atc tct ccc 96  
 Asn Arg Trp Ser Tyr Asp Ser Leu Lys Asn Phe Arg Gln Ile Ser Pro  
 20 25 30  
 20 ttt gtt caa act cat ctc aaa aag gtc tac ctt tca tta tgt tgt gct 144  
 Phe Val Gln Thr His Leu Lys Lys Val Tyr Leu Ser Leu Cys Cys Ala  
 35 40 45  
 25 tta gtt gct tcg gct gct gga gct tac ctt cac att ctt tgg aac att 192  
 Leu Val Ala Ser Ala Ala Gly Ala Tyr Leu His Ile Leu Trp Asn Ile  
 50 55 60  
 30 ggt ggc tta ctt acg aca ttg gga tgt gtg gga agc ata gtg tgg ctg 240  
 Gly Gly Leu Leu Thr Thr Leu Gly Cys Val Gly Ser Ile Val Trp Leu  
 65 70 75 80  
 35 atg gcg aca cct ctg tat gaa gag caa aag agg ata gca ctt ctg atg 288  
 Met Ala Thr Pro Leu Tyr Glu Glu Gln Lys Arg Ile Ala Leu Leu Met  
 85 90 95  
 40 gca gct gca ctg ttt aaa gga gca tct att ggt cca ctg att gaa ttg 336  
 Ala Ala Ala Leu Phe Lys Gly Ala Ser Ile Gly Pro Leu Ile Glu Leu  
 100 105 110  
 45 gct att gac ttt gac cca agc att gtg atc ggt gct ttt gtt ggt tgt 384  
 Ala Ile Asp Phe Asp Pro Ser Ile Val Ile Gly Ala Phe Val Gly Cys  
 115 120 125  
 50 gct gtg gct ttt ggt tgc ttc tca gct gct gcc atg gtg gca agg cgc 432  
 Ala Val Ala Phe Gly Cys Phe Ser Ala Ala Ala Met Val Ala Arg Arg  
 130 135 140  
 55 aga gag tac ttg tat ctt gga ggt ctt ctt tca tct ggt ctc tct atc 480  
 Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser Gly Leu Ser Ile  
 145 150 155 160  
 60 ctt ttc tgg ttg cac ttc gcg tcc tcc att ttt ggt ggt tct atg gcc 528  
 Leu Phe Trp Leu His Phe Ala Ser Ser Ile Phe Gly Gly Ser Met Ala  
 165 170 175  
 65 ttg ttc aag ttc gag gtt tat ttt ggg ctc ttg gtg ttt gtg ggc tat 576  
 Leu Phe Lys Phe Glu Val Tyr Phe Gly Leu Leu Val Phe Val Gly Tyr  
 180 185 190  
 70 atc att ttt gac acc caa gat ata att gag aag gca cac ctt ggg gat 624  
 Ile Ile Phe Asp Thr Gln Asp Ile Ile Glu Lys Ala His Leu Gly Asp  
 195 200 205  
 75 ttg gac tac gtg aag cat gct ctg acc ctc ttt aca gat ttt gtt gct 672  
 Leu Asp Tyr Val Lys His Ala Leu Thr Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala  
 210 215 220  
 80 gtt ttt gtg cga ata tta atc ata atg ctg aag aat gca tcc gac aag 720  
 Val Phe Val Arg Ile Leu Ile Ile Met Leu Lys Asn Ala Ser Asp Lys  
 225 230 235 240  
 85 gaa gag aag aag aag aag agg aga aac taatgcataa gcggttattc 767  
 Glu Glu Lys Lys Lys Lys Arg Arg Asn  
 245

aaagactctg taactctaga atctggcatt ttcttgttca taaacttctg tagaccttcg 827  
 acaagtatgt tgtaaatagt ttggtaacgc ctcagattaa gctgcgaggc tctgttatgc 887  
 5 cgcattgcaa tgtggttatg gtggtacata gatggttttg tttccgaagc ataccatcaa 947  
 ataacatgca tgtttacact atatcgataa cctacgagtg tactacttat ttctgctccc 1007  
 10 ttttgctgtg ttaggttggt catgattgta tagttgattt tccgttatgt tagaccatct 1067  
 tctttcttga cgtttaattt ctcattattga tgggagaaat gaaaattcac accgtcgccc 1127  
 caacttggtt aagactgagg cgcaattgta gtt 1160

15

<210> 6  
 <211> 249  
 <212> PRT  
 <213> Nicotiana tabacum

20

<400> 6  
 Met Glu Ser Cys Thr Ser Phe Phe Asn Ser Gln Ser Ala Ser Ser Arg  
 1 5 10 15

25

Asn Arg Trp Ser Tyr Asp Ser Leu Lys Asn Phe Arg Gln Ile Ser Pro  
 20 25 30

Phe Val Gln Thr His Leu Lys Lys Val Tyr Leu Ser Leu Cys Cys Ala  
 35 40 45

30

Leu Val Ala Ser Ala Ala Gly Ala Tyr Leu His Ile Leu Trp Asn Ile  
 50 55 60

35

Gly Gly Leu Leu Thr Thr Leu Gly Cys Val Gly Ser Ile Val Trp Leu  
 65 70 75 80

Met Ala Thr Pro Leu Tyr Glu Glu Gln Lys Arg Ile Ala Leu Leu Met  
 85 90 95

40

Ala Ala Ala Leu Phe Lys Gly Ala Ser Ile Gly Pro Leu Ile Glu Leu  
 100 105 110

Ala Ile Asp Phe Asp Pro Ser Ile Val Ile Gly Ala Phe Val Gly Cys  
 115 120 125

45

Ala Val Ala Phe Gly Cys Phe Ser Ala Ala Ala Met Val Ala Arg Arg  
 130 135 140

50

Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser Gly Leu Ser Ile  
 145 150 155 160

Leu Phe Trp Leu His Phe Ala Ser Ser Ile Phe Gly Gly Ser Met Ala  
 165 170 175

55

Leu Phe Lys Phe Glu Val Tyr Phe Gly Leu Leu Val Phe Val Gly Tyr  
 180 185 190

Ile Ile Phe Asp Thr Gln Asp Ile Ile Glu Lys Ala His Leu Gly Asp  
 195 200 205

60

Leu Asp Tyr Val Lys His Ala Leu Thr Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala  
 210 215 220

65

Val Phe Val Arg Ile Leu Ile Ile Met Leu Lys Asn Ala Ser Asp Lys  
 225 230 235 240

Glu Glu Lys Lys Lys Lys Arg Arg Asn  
 245

70

<210> 7  
 <211> 1056



&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Oryza sativa

&lt;220&gt;

5 &lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(747)

&lt;223&gt; coding for BII-protein

&lt;400&gt; 7

10	atg gac gcc ttc tac tcg acc tcg tcg gcg tac gga gcg gcg gcg agc	48
	Met Asp Ala Phe Tyr Ser Thr Ser Ser Ala Tyr Gly Ala Ala Ser	
	1 5 10 15	
15	ggc tgg ggc tac gac tcg ctg aag aac ttc cgc cag atc tcc ccc gcc	96
	Gly Trp Gly Tyr Asp Ser Leu Lys Asn Phe Arg Gln Ile Ser Pro Ala	
	20 25 30	
20	gtc cag tcc cac ctc aag ctc gtt tac ctg aca cta tgc gtc gcc ctg	144
	Val Gln Ser His Leu Lys Leu Val Tyr Leu Thr Leu Cys Val Ala Leu	
	35 40 45	
25	gct gcg tcg gcg gtg ggc gca tac ctg cac gtc gcc ttg aac atc ggc	192
	Ala Ala Ser Ala Val Gly Ala Tyr Leu His Val Leu Asn Ile Gly	
	50 55 60	
30	ggg atg ttg act atg ctc ggg tgc gtg ggg agc atc gcc tgg ttg ttc	240
	Gly Met Leu Thr Met Leu Gly Cys Val Gly Ser Ile Ala Trp Leu Phe	
	65 70 75 80	
35	tcg gtg cct gtc ttt gag gag agg aag agg ttt ggg att ctc ttg gcc	288
	Ser Val Pro Val Phe Glu Glu Arg Lys Arg Phe Gly Ile Leu Leu Ala	
	85 90 95	
40	gct gcc ctg ctg gaa ggg gct tca gtt ggg cct ctg atc aag ctt gct	336
	Ala Ala Leu Leu Glu Gly Ala Ser Val Gly Pro Leu Ile Lys Leu Ala	
	100 105 110	
45	gta gac ttt gac tca agc att ctc gta aca gca ttt gtt gga act gcc	384
	Val Asp Phe Asp Ser Ser Ile Leu Val Thr Ala Phe Val Gly Thr Ala	
	115 120 125	
50	att gca ttt ggg tgc ttc act tgc gct gcc atc gtt gcc aag cgt agg	432
	Ile Ala Phe Gly Cys Phe Thr Cys Ala Ala Ile Val Ala Lys Arg Arg	
	130 135 140	
55	gag tac ctc tac ctt ggt ggt ttg ctc tct tct ggc ctc tcc atc ctg	480
	Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser Gly Leu Ser Ile Leu	
	145 150 155 160	
60	ctc tgg ctg cag ttt gcc gca tcc atc ttt ggc cac tcc acc ggc agc	528
	Leu Trp Leu Gln Phe Ala Ala Ser Ile Phe Gly His Ser Thr Gly Ser	
	165 170 175	
65	ttc atg ttt gag gtt tac ttt ggc ctg ttg atc ttc ctg ggg tac atg	576
	Phe Met Phe Glu Val Tyr Phe Gly Leu Leu Ile Phe Leu Gly Tyr Met	
	180 185 190	
70	gtg tat gac acg cag gag atc atc gag agg gct cac cac ggt gac atg	624
	Val Tyr Asp Thr Gln Glu Ile Ile Glu Arg Ala His His Gly Asp Met	
	195 200 205	
75	gac tac atc aag cac gca ctc acc ctc ttc act gac ttc gtg gcc gtc	672
	Asp Tyr Ile Lys His Ala Leu Thr Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala Val	
	210 215 220	
80	ctt gtc cgg atc ctc gtc atc atg ctc aag aac gcg tct gac aag tcg	720
	Leu Val Arg Ile Leu Val Ile Met Leu Lys Asn Ala Ser Asp Lys Ser	
	225 230 235 240	
85	gag gag aag aag agg aag aag agg tct tgagagcttc tcttcccgcgt	767
	Glu Glu Lys Lys Arg Lys Lys Arg Ser	
	245	

ttgcacataa gaaaaaacca ccgoggctat tgctctacg tattatgaca gagccgcact 827  
tcaactgggt tttatggtga atacaagttc ttttgcattt tggtgatacg gtgtgaatct 887  
5 tctcagggtt gtcgtcgtag tagctttgca aatactagca tgctacatga cacggatctt 947  
tctgtaatgg tggtcgcgtt gatcgaaacg tgaaaacaca tcttcatttg cgactaattt 1007  
10 gtttgccttt tggtgattga tgatgatcct ttccccaaaa aaaaaaaaaa 1056

<210> 8  
<211> 249  
<212> PRT  
15 <213> Oryza sativa

<400> 8  
Met Asp Ala Phe Tyr Ser Thr Ser Ser Ala Tyr Gly Ala Ala Ala Ser  
1 5 10 15  
20 Gly Trp Gly Tyr Asp Ser Leu Lys Asn Phe Arg Gln Ile Ser Pro Ala  
20 25 30  
25 Val Gln Ser His Leu Lys Leu Val Tyr Leu Thr Leu Cys Val Ala Leu  
35 40 45  
Ala Ala Ser Ala Val Gly Ala Tyr Leu His Val Ala Leu Asn Ile Gly  
50 55 60  
30 Gly Met Leu Thr Met Leu Gly Cys Val Gly Ser Ile Ala Trp Leu Phe  
65 70 75 80  
Ser Val Pro Val Phe Glu Glu Arg Lys Arg Phe Gly Ile Leu Leu Ala  
85 90 95  
35 Ala Ala Leu Leu Glu Gly Ala Ser Val Gly Pro Leu Ile Lys Leu Ala  
100 105 110  
40 Val Asp Phe Asp Ser Ser Ile Leu Val Thr Ala Phe Val Gly Thr Ala  
115 120 125  
Ile Ala Phe Gly Cys Phe Thr Cys Ala Ala Ile Val Ala Lys Arg Arg  
130 135 140  
45 Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser Gly Leu Ser Ile Leu  
145 150 155 160  
Leu Trp Leu Gln Phe Ala Ala Ser Ile Phe Gly His Ser Thr Gly Ser  
165 170 175  
50 Phe Met Phe Glu Val Tyr Phe Gly Leu Leu Ile Phe Leu Gly Tyr Met  
180 185 190  
55 Val Tyr Asp Thr Gln Glu Ile Ile Glu Arg Ala His His Gly Asp Met  
195 200 205  
Asp Tyr Ile Lys His Ala Leu Thr Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala Val  
210 215 220  
60 Leu Val Arg Ile Leu Val Ile Met Leu Lys Asn Ala Ser Asp Lys Ser  
225 230 235 240  
Glu Glu Lys Lys Arg Lys Lys Arg Ser  
245  
65

<210> 9  
<211> 973  
70 <212> DNA  
<213> Brassica napus

<220>

<221> CDS  
 <222> (1)..(741)  
 <223> coding for BII-protein

5 <400> 9  
 atg gat tca ttc tcg tcc ttc ttc gat tct caa cct ggt agc aga agc 48  
 Met Asp Ser Phe Ser Ser Phe Phe Asp Ser 10 Gln Pro Gly Ser Arg Ser 15

10 tgg agc tat gat tct ctc aaa aac ctc cgt cag att tct ccc tcc gtc 96  
 Trp Ser Tyr Asp Ser Leu Lys Asn Leu Arg Gln Ile Ser Pro Ser Val 20 25 30

15 cag aat cat ctc aag agg gtt tat ctc act ctg tgt tgt gct ctc gtt 144  
 Gln Asn His Leu Lys Arg Val Tyr Leu Thr Leu Cys Cys Ala Leu Val 35 40 45

20 gcg tct gcg ttt gga gct tac ctc cac gtg ctc tgg aac ata ggt ggt 192  
 Ala Ser Ala Phe Gly Ala Tyr Leu His Val Leu Trp Asn Ile Gly Gly 50 55 60

25 att ctc act acc att gga tgc ttt gga agc atg att tgg ctg ctc tcc 240  
 Ile Leu Thr Thr Ile Gly Cys Phe Gly Ser Met Ile Trp Leu Leu Ser 65 70 75 80

30 tgt cct cct tat gaa caa caa aag agg ctt tcc ctt ctg ttt ctg tct 288  
 Cys Pro Pro Tyr Gln Gln Lys Arg Leu Ser Leu Leu Phe Leu Ser 85 90 95

35 gct gtt ctc gaa ggt gct tca gtt ggt ccc ttg atc aaa gtg gca gtt 336  
 Ala Val Leu Glu Gly Ala Ser Val Gly Pro Leu Ile Lys Val Ala Val 100 105 110

40 gat ttt gac cca agc atc ctc atc act gcg ttt gtc gga act gcg ata 384  
 Asp Phe Asp Pro Ser Ile Leu Ile Thr Ala Phe Val Gly Thr Ala Ile 115 120 125

45 gcc ttt atc tgt ttc tca ggg gca gcg atg ttg gca aga cgc aga gag 432  
 Ala Phe Ile Cys Phe Ser Gly Ala Ala Met Leu Ala Arg Arg Arg Glu 130 135 140

50 tac ctc tac ctc gga gga ctg ctt tca tct ggc ttg tcc atg ctt atg 480  
 Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser Gly Leu Ser Met Leu Met 145 150 155 160

55 tgg ctt cag ttt gcc tct tcc atc ttt ggt ggc tct gca tcc atc ttt 528  
 Trp Leu Gln Phe Ala Ser Ser Ile Phe Gly Gly Ser Ala Ser Ile Phe 165 170 175

60 aag ttt gag ctc tac ttt gga ctc ttg atc ttt gtg gga tac atg gtg 576  
 Lys Phe Glu Leu Tyr Phe Gly Leu Leu Ile Phe Val Gly Tyr Met Val 180 185 190

65 gtg gac act caa gat att ata gag aag gcc cac ctc ggt gac atg gat 624  
 Val Asp Thr Gln Asp Ile Ile Glu Lys Ala His Leu Gly Asp Met Asp 195 200 205

70 tac gtg aaa cat tcg ttg acc ctt ttc acc gat ttt gta gct gtg ttt 672  
 Tyr Val Lys His Ser Leu Thr Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala Val Phe 210 215 220

75 gtt cgt gtt ctc atc att atg ctg aag aac tcg gca gat aaa gaa gat 720  
 Val Arg Val Leu Ile Ile Met Leu Lys Asn Ser Ala Asp Lys Glu Asp 225 230 235 240

80 aaa aag aag agg agg agg aac tgagactaaa aagtgagaaa gaaagctaaa 771  
 Lys Lys Lys Arg Arg Arg Asn 245

85 tagagtgggt gttatgtgtg tttcaaaaaa taaaaaagag tgggtgttat aagtacagac 831  
 atgatagcgt tgggtgtttt tacttgittg gaacagtttt ggtaacaaca cacgttacgt 891

atttgtgtat tcctcttagt gactccagat tgtgaatgga tcagtatctt gaaactgtgt 951  
 tgaaaattat cagttgggag ct 973

5

<210> 10  
 <211> 247  
 <212> PRT  
 <213> Brassica napus

10

<400> 10  
 Met Asp Ser Phe Ser Ser Phe Phe Asp Ser Gln Pro Gly Ser Arg Ser  
 1 5 10 15

15

Trp Ser Tyr Asp Ser Leu Lys Asn Leu Arg Gln Ile Ser Pro Ser Val  
 20 25 30

20

Gln Asn His Leu Lys Arg Val Tyr Leu Thr Leu Cys Cys Ala Leu Val  
 35 40 45

25

Ala Ser Ala Phe Gly Ala Tyr Leu His Val Leu Trp Asn Ile Gly Gly  
 50 55 60

Ile Leu Thr Thr Ile Gly Cys Phe Gly Ser Met Ile Trp Leu Leu Ser  
 65 70 75 80

Cys Pro Pro Tyr Glu Gln Gln Lys Arg Leu Ser Leu Leu Phe Leu Ser  
 85 90 95

30

Ala Val Leu Glu Gly Ala Ser Val Gly Pro Leu Ile Lys Val Ala Val  
 100 105 110

35

Asp Phe Asp Pro Ser Ile Leu Ile Thr Ala Phe Val Gly Thr Ala Ile  
 115 120 125

Ala Phe Ile Cys Phe Ser Gly Ala Ala Met Leu Ala Arg Arg Arg Glu  
 130 135 140

40

Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser Gly Leu Ser Met Leu Met  
 145 150 155 160

Trp Leu Gln Phe Ala Ser Ser Ile Phe Gly Gly Ser Ala Ser Ile Phe  
 165 170 175

45

Lys Phe Glu Leu Tyr Phe Gly Leu Leu Ile Phe Val Gly Tyr Met Val  
 180 185 190

Val Asp Thr Gln Asp Ile Ile Glu Lys Ala His Leu Gly Asp Met Asp  
 195 200 205

50

Tyr Val Lys His Ser Leu Thr Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala Val Phe  
 210 215 220

55

Val Arg Val Leu Ile Ile Met Leu Lys Asn Ser Ala Asp Lys Glu Asp  
 225 230 235 240

Lys Lys Lys Arg Arg Arg Asn  
 245

60

<210> 11  
 <211> 747  
 <212> DNA  
 <213> Glycine max

65

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(744)  
 <223> coding for BII1-protein

70

<400> 11  
 cga ttg caa gca atg gac gcc ttc aat tcc ttc ttc gat tca aga aac 48

	Arg	Leu	Gln	Ala	Met	Asp	Ala	Phe	Asn	Ser	Phe	Phe	Asp	Ser	Arg	Asn	
	1				5					10					15		
5	cga	tgg	aat	tac	gat	act	ctc	aaa	aac	ttc	cgt	cag	att	tct	ccg	gtc	96
	Arg	Trp	Asn	Tyr	Asp	Thr	Leu	Lys	Asn	Phe	Arg	Gln	Ile	Ser	Pro	Val	
				20					25					30			
10	gtg	cag	aat	cac	ctg	aag	cag	gtt	tat	ttt	act	ctg	tgt	ttt	gcc	gtg	144
	Val	Gln	Asn	His	Leu	Lys	Gln	Val	Tyr	Phe	Thr	Leu	Cys	Phe	Ala	Val	
				35				40					45				
15	gtt	gct	gcg	gct	gtc	ggg	gct	tac	ctt	cat	gtc	ctc	ttg	aac	att	ggg	192
	Val	Ala	Ala	Ala	Val	Gly	Ala	Tyr	Leu	His	Val	Leu	Leu	Asn	Ile	Gly	
				50			55					60					
20	ggt	ttt	ctt	act	aca	gtg	gca	tgc	atg	gga	agc	agc	ttt	tgg	tta	ctc	240
	Gly	Phe	Leu	Thr	Thr	Val	Ala	Cys	Met	Gly	Ser	Ser	Phe	Trp	Leu	Leu	
						70				75						80	
25	tcc	aca	cct	cct	ttt	gaa	gag	agg	aag	agg	gtg	act	ttg	ttg	atg	gcc	288
	Ser	Thr	Pro	Pro	Phe	Glu	Glu	Arg	Lys	Arg	Val	Thr	Leu	Leu	Met	Ala	
					85				90						95		
30	gca	tca	ctg	ttt	cag	ggt	tcc	tct	att	gga	ccc	ttg	att	gat	ttg	gct	336
	Ala	Ser	Leu	Phe	Gln	Gly	Ser	Ser	Ile	Gly	Pro	Leu	Ile	Asp	Leu	Ala	
				100					105					110			
35	att	cat	atc	gat	cca	agc	ctt	atc	ttt	agt	gca	ttt	gtg	gga	aca	gcc	384
	Ile	His	Ile	Asp	Pro	Ser	Leu	Ile	Phe	Ser	Ala	Phe	Val	Gly	Thr	Ala	
				115				120					125				
40	ttg	gcc	ttt	gca	tgc	ttc	tca	gga	gca	gct	ttg	gtt	gct	agg	cgt	agg	432
	Leu	Ala	Phe	Ala	Cys	Phe	Ser	Gly	Ala	Ala	Leu	Val	Ala	Arg	Arg	Arg	
				130				135				140					
45	gag	tac	ctg	tac	ctt	ggt	ggc	ttg	gtt	tct	tct	gga	ttg	tcc	atc	ctt	480
	Glu	Tyr	Leu	Tyr	Leu	Gly	Gly	Leu	Val	Ser	Ser	Gly	Leu	Ser	Ile	Leu	
						150				155						160	
50	ctc	tgg	ttg	cac	ttt	gct	tct	tcc	atc	ttt	gga	ggc	tca	aca	gct	ctc	528
	Leu	Trp	Leu	His	Phe	Ala	Ser	Ser	Ile	Phe	Gly	Gly	Ser	Thr	Ala	Leu	
				165					170						175		
55	ttt	aag	ttt	gag	ttg	tac	ttt	ggg	ctt	ttg	gtg	ttt	gta	ggt	tac	att	576
	Phe	Lys	Phe	Glu	Leu	Tyr	Phe	Gly	Leu	Leu	Val	Phe	Val	Gly	Tyr	Ile	
				180				185						190			
60	gta	gta	gac	acc	caa	gaa	ata	gtt	gag	agg	gca	cac	ttg	ggc	gat	ctg	624
	Val	Val	Asp	Thr	Gln	Glu	Ile	Val	Glu	Arg	Ala	His	Leu	Gly	Asp	Leu	
				195				200					205				
65	gac	tat	gta	aag	cat	gcc	ttg	acc	ttg	ttt	acc	gat	ttg	gtc	gca	gtt	672
	Asp	Tyr	Val	Lys	His	Ala	Leu	Thr	Leu	Phe	Thr	Asp	Leu	Val	Ala	Val	
				210			215					220					
70	ttt	gtc	cgg	att	ctt	gtt	att	atg	ttg	aag	aat	tcg	act	gag	agg	aat	720
	Phe	Val	Arg	Ile	Leu	Val	Ile	Met	Leu	Lys	Asn	Ser	Thr	Glu	Arg	Asn	
						230				235						240	
75	gag	aag	aaa	aag	aag	aga	aga	gat	tga								747
	Glu	Lys	Lys	Lys	Lys	Arg	Arg	Asp									
					245												
80	<210>	12															
	<211>	248															
	<212>	PRT															
	<213>	Glycine max															
85	<400>	12															
	Arg	Leu	Gln	Ala	Met	Asp	Ala	Phe	Asn	Ser	Phe	Phe	Asp	Ser	Arg	Asn	
	1				5					10					15		

## 12

	Arg	Trp	Asn	Tyr	Asp	Thr	Leu	Lys	Asn	Phe	Arg	Gln	Ile	Ser	Pro	Val	
			20						25					30			
5	Val	Gln	Asn	His	Leu	Lys	Gln	Val	Tyr	Phe	Thr	Leu	Cys	Phe	Ala	Val	
			35					40					45				
	Val	Ala	Ala	Ala	Val	Gly	Ala	Tyr	Leu	His	Val	Leu	Leu	Asn	Ile	Gly	
		50					55					60					
10	Gly	Phe	Leu	Thr	Thr	Val	Ala	Cys	Met	Gly	Ser	Ser	Phe	Trp	Leu	Leu	
	65					70					75					80	
	Ser	Thr	Pro	Pro	Phe	Glu	Glu	Arg	Lys	Arg	Val	Thr	Leu	Leu	Met	Ala	
15					85					90					95		
	Ala	Ser	Leu	Phe	Gln	Gly	Ser	Ser	Ile	Gly	Pro	Leu	Ile	Asp	Leu	Ala	
				100					105					110			
20	Ile	His	Ile	Asp	Pro	Ser	Leu	Ile	Phe	Ser	Ala	Phe	Val	Gly	Thr	Ala	
			115					120					125				
	Leu	Ala	Phe	Ala	Cys	Phe	Ser	Gly	Ala	Ala	Leu	Val	Ala	Arg	Arg	Arg	
		130					135					140					
25	Glu	Tyr	Leu	Tyr	Leu	Gly	Gly	Leu	Val	Ser	Ser	Gly	Leu	Ser	Ile	Leu	
	145					150					155					160	
	Leu	Trp	Leu	His	Phe	Ala	Ser	Ser	Ile	Phe	Gly	Gly	Ser	Thr	Ala	Leu	
30				165						170					175		
	Phe	Lys	Phe	Glu	Leu	Tyr	Phe	Gly	Leu	Leu	Val	Phe	Val	Gly	Tyr	Ile	
				180				185						190			
35	Val	Val	Asp	Thr	Gln	Glu	Ile	Val	Glu	Arg	Ala	His	Leu	Gly	Asp	Leu	
			195					200					205				
	Asp	Tyr	Val	Lys	His	Ala	Leu	Thr	Leu	Phe	Thr	Asp	Leu	Val	Ala	Val	
		210					215					220					
40	Phe	Val	Arg	Ile	Leu	Val	Ile	Met	Leu	Lys	Asn	Ser	Thr	Glu	Arg	Asn	
	225				230						235					240	
	Glu	Lys	Lys	Lys	Lys	Arg	Arg	Asp									
45					245												
	<210> 13																
	<211> 1510																
50	<212> DNA																
	<213> Glycine max																
	<220>																
	<221> CDS																
55	<222> (1)..(777)																
	<223> coding for BI-1 protein																
	<400> 13																
60	atc	acg	aaa	act	ata	cga	ttc	gat	tcc	ttg	ttt	tcg	atg	gac	act	ttc	48
	Ile	Thr	Lys	Thr	Ile	Arg	Phe	Asp	Ser	Leu	Phe	Ser	Met	Asp	Thr	Phe	
	1				5					10					15		
	ttc	aag	tcc	cca	tct	tct	tct	tct	tcg	aga	agc	cgc	tgg	agt	tac	gat	96
65	Phe	Lys	Ser	Pro	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Arg	Ser	Arg	Trp	Ser	Tyr	Asp	
				20					25					30			
	act	ctc	aag	aat	ttc	cgc	gag	atc	tct	ccg	ctc	gtt	cag	aat	cac	atc	144
	Thr	Leu	Lys	Asn	Phe	Arg	Glu	Ile	Ser	Pro	Leu	Val	Gln	Asn	His	Ile	
70			35					40					45				
	aaa	ctg	gtt	tat	ttt	acg	tta	tgt	tgc	gct	gtg	gtg	gct	gct	gct	gtt	192
	Lys	Leu	Val	Tyr	Phe	Thr	Leu	Cys	Cys	Ala	Val	Val	Ala	Ala	Ala	Val	
		50					55					60					

5	gga gct ttc ctt cat gtt ctg tgg aac att ggc ggt ttt ctc acc acg 240 Gly Ala Phe Leu His Val Leu Trp Asn Ile Gly Gly Phe Leu Thr Thr 80 65 70 75
10	ttg gct tcc att ggg agc atg ttt tgg ttg cta tct aca ccc cct ttt 288 Leu Ala Ser Ile Gly Ser Met Phe Trp Leu Leu Ser Thr Pro Pro Phe 95 85 90
15	gaa gag caa aag agg ttg tct ctg ttg atg gct tgg gcc ctg ttt cag 336 Glu Glu Gln Lys Arg Leu Ser Leu Leu Met Ala Ser Ala Leu Phe Gln 110 100 105
20	ggc gct tcc att gga cct ctg att gat ttg gct ttt gcc att gat cct 384 Gly Ala Ser Ile Gly Pro Leu Ile Asp Leu Ala Phe Ala Ile Asp Pro 125 115 120
25	ggc ctt atc att ggc gca ttt gtg gca act tct ttg gct ttt gct tgc 432 Gly Leu Ile Ile Gly Ala Phe Val Ala Thr Ser Leu Ala Phe Ala Cys 140 130 135
30	ttt tct gca gta gcc tta gtt gca agg cga agg gag tac ctc tac ctt 480 Phe Ser Ala Val Ala Leu Val Ala Arg Arg Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu 160 145 150 155
35	ggc ggt ttg ctt tct tct tgg ctt tcc att ctt atg tgg ttg cac tct 528 Gly Gly Leu Leu Ser Ser Trp Leu Ser Ile Leu Met Trp Leu His Ser 175 165 170
40	gat tcc tct ctc ttt ggg ggc tca att gca ctc ttc aag ttt gag ctg 576 Asp Ser Ser Leu Phe Gly Gly Ser Ile Ala Leu Phe Lys Phe Glu Leu 190 180 185
45	tac ttt ggg ctt ttg gtg ttt gtg ggc tac gtt ata gta gac act caa 624 Tyr Phe Gly Leu Leu Val Phe Val Gly Tyr Val Ile Val Asp Thr Gln 205 195 200
50	gaa att att gaa agg gct cac ttt ggt gac ctg gat tat gtg aag cat 672 Glu Ile Ile Glu Arg Ala His Phe Gly Asp Leu Asp Tyr Val Lys His 220 210 215
55	gca ttg aca ttg ttc act gat ttg gct gca atc ttt gtg cga att ctt 720 Ala Leu Thr Leu Phe Thr Asp Leu Ala Ala Ile Phe Val Arg Ile Leu 240 225 230 235
60	att ata atg ttg aag aat tca tct gag aga aat gag aag aag aag aaa 768 Ile Ile Met Leu Lys Asn Ser Ser Glu Arg Asn Glu Lys Lys Lys Lys 255 245 250
65	agg aga gat tagtaggctg accgaccgac tcgagctcag gcttctctac 817 Arg Arg Asp
70	agtaatttag tttgtggaga atacataatt agctgttttag atgatgttgg tcccttgtgt 877
75	agtttagtttag ctatgtgttt gctgtaattgg taaatgtcag gatttctttt aaacatcttc 937
80	atatgtattt gccaatatca taatgtgtcg tataacatca taccttgggt taaaaaaaaa 997
85	aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaann nnnnnnnnnn 1057
90	nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnngg tgtttgtggg ctacgttata 1117
95	gtagacactc aagtaatcat tgagagggct cactttgggtg acctggatta tgtaagcat 1177
100	gcattgacac tgttctactga tttggctgca atctttgtgc gaattcttaa tataatgttg 1237
105	aataattcat ctaagagaaa tgagaagaag aggaggagag attaataagg taccgattg 1297
110	ctatgtgtag agtaatttgg tttgtagaga atacataatt agctgttttag aagttgttgg 1357
115	tccccttgtg tagtttagtag ttagctatgt gtttgctgta atggtaaag tcaggatttc 1417
120	ttttaaacat tttcatatgt atttgctaata aatcataata tatagtataa acatcattcc 1477

ttgggttttaa aaaagaaaaa aaaaaaaaaa aaa

1510

5 <210> 14  
 <211> 259  
 <212> PRT  
 <213> Glycine max

10 <400> 14  
 Ile Thr Lys Thr Ile Arg Phe Asp Ser Leu Phe Ser Met Asp Thr Phe  
 1 5 10 15

15 Phe Lys Ser Pro Ser Ser Ser Ser Ser Arg Ser Arg Trp Ser Tyr Asp  
 20 25 30  
 Thr Leu Lys Asn Phe Arg Glu Ile Ser Pro Leu Val Gln Asn His Ile  
 35 40 45

20 Lys Leu Val Tyr Phe Thr Leu Cys Cys Ala Val Val Ala Ala Ala Val  
 50 55 60

25 Gly Ala Phe Leu His Val Leu Trp Asn Ile Gly Gly Phe Leu Thr Thr  
 65 70 75 80  
 Leu Ala Ser Ile Gly Ser Met Phe Trp Leu Leu Ser Thr Pro Pro Phe  
 85 90 95

30 Glu Glu Gln Lys Arg Leu Ser Leu Leu Met Ala Ser Ala Leu Phe Gln  
 100 105 110  
 Gly Ala Ser Ile Gly Pro Leu Ile Asp Leu Ala Phe Ala Ile Asp Pro  
 115 120 125

35 Gly Leu Ile Ile Gly Ala Phe Val Ala Thr Ser Leu Ala Phe Ala Cys  
 130 135 140

40 Phe Ser Ala Val Ala Leu Val Ala Arg Arg Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu  
 145 150 155 160  
 Gly Gly Leu Leu Ser Ser Trp Leu Ser Ile Leu Met Trp Leu His Ser  
 165 170 175

45 Asp Ser Ser Leu Phe Gly Gly Ser Ile Ala Leu Phe Lys Phe Glu Leu  
 180 185 190  
 Tyr Phe Gly Leu Leu Val Phe Val Gly Tyr Val Ile Val Asp Thr Gln  
 195 200 205

50 Glu Ile Ile Glu Arg Ala His Phe Gly Asp Leu Asp Tyr Val Lys His  
 210 215 220

55 Ala Leu Thr Leu Phe Thr Asp Leu Ala Ala Ile Phe Val Arg Ile Leu  
 225 230 235 240  
 Ile Ile Met Leu Lys Asn Ser Ser Glu Arg Asn Glu Lys Lys Lys Lys  
 245 250 255

60 Arg Arg Asp

65 <210> 15  
 <211> 651  
 <212> DNA  
 <213> Triticum aestivum

70 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(651)  
 <223> coding for BI-1 protein



<400> 15																	
	gtc	gca	atg	ccg	ggt	cga	cga	ttt	cgt	ctg	acc	tat	gct	ttg	cct	ggc	48
	Val	Ala	Met	Pro	Gly	Arg	Arg	Phe	Arg	Leu	Thr	Tyr	Ala	Leu	Pro	Gly	
5	1				5					10					15		
	ctc	atc	tgc	cgt	ggg	tgc	tta	cct	gca	cat	tgc	cct	gaa	cat	tgg	cgg	96
	Leu	Ile	Cys	Arg	Gly	Cys	Leu	Pro	Ala	His	Cys	Pro	Glu	His	Trp	Arg	
				20					25					30			
10	gat	gct	gac	aat	gct	cgc	gtg	tat	cgg	aac	cat	cgc	ctg	gat	gtt	ctc	144
	Asp	Ala	Asp	Asn	Ala	Arg	Val	Tyr	Arg	Asn	His	Arg	Leu	Asp	Val	Leu	
				35				40					45				
15	ggt	gcc	agt	cta	cga	gga	gag	gaa	gag	gtt	tgg	gct	gct	gat	ggg	tgc	192
	Gly	Ala	Ser	Leu	Arg	Gly	Glu	Glu	Glu	Val	Trp	Ala	Ala	Asp	Gly	Cys	
		50					55					60					
20	agc	ctc	ctg	gaa	ggg	gct	tca	gtt	gga	cct	ctg	att	gag	ctt	gcc	ata	240
	Ser	Leu	Leu	Glu	Gly	Ala	Ser	Val	Gly	Pro	Leu	Ile	Glu	Leu	Ala	Ile	
		65				70					75					80	
25	gac	ttt	gac	cca	agt	atc	ctc	gtg	aca	ggg	ttt	gtc	gga	acc	gcc	atc	288
	Asp	Phe	Asp	Pro	Ser	Ile	Leu	Val	Thr	Gly	Phe	Val	Gly	Thr	Ala	Ile	
					85					90					95		
	gcc	ttc	ggg	tgc	ttc	tct	ggc	gcc	gcc	atc	atc	gcc	aag	cgc	agg	gag	336
	Ala	Phe	Gly	Cys	Phe	Ser	Gly	Ala	Ala	Ile	Ile	Ala	Lys	Arg	Arg	Glu	
				100				105					110				
30	tac	ctg	tac	ctc	ggt	ggt	ctg	ctc	tcc	tcc	ggc	ctg	tgc	atc	ctg	ctc	384
	Tyr	Leu	Tyr	Leu	Gly	Gly	Leu	Leu	Ser	Ser	Gly	Leu	Ser	Ile	Leu	Leu	
				115				120					125				
35	tgg	ctg	cag	ttt	gcc	acg	tcc	atc	ttt	ggc	cac	tcc	tct	ggc	agc	ttc	432
	Trp	Leu	Gln	Phe	Ala	Thr	Ser	Ile	Phe	Gly	His	Ser	Ser	Gly	Ser	Phe	
		130					135					140					
40	atg	ttt	gag	gtt	tac	ttt	ggc	ctg	ttg	atc	ttc	ctg	gga	tac	atg	gtg	480
	Met	Phe	Glu	Val	Tyr	Phe	Gly	Leu	Leu	Ile	Phe	Leu	Gly	Tyr	Met	Val	
		145				150					155					160	
45	tac	gac	acg	cag	gag	atc	atc	gag	agg	gcg	cac	cac	ggc	gac	atg	gat	528
	Tyr	Asp	Thr	Gln	Glu	Ile	Ile	Glu	Arg	Ala	His	His	Gly	Asp	Met	Asp	
					165					170					175		
	tac	atc	aag	cac	gcg	ctc	acc	ctc	ttc	acc	gac	ttc	gtc	gcc	gtt	ctc	576
	Tyr	Ile	Lys	His	Ala	Leu	Thr	Leu	Phe	Thr	Asp	Phe	Val	Ala	Val	Leu	
				180				185					190				
50	gtc	cgc	gtc	ctc	atc	atc	ttg	ctc	aag	aac	gca	gcg	gac	aag	gtc	gga	624
	Val	Arg	Val	Leu	Ile	Ile	Leu	Leu	Lys	Asn	Ala	Ala	Asp	Lys	Val	Gly	
				195				200					205				
55	ggc	caa	gaa	gag	gag	gaa	gag	aag	tcc								651
	Gly	Gln	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Lys	Ser								
		210					215										
60	<210> 16																
	<211> 217																
	<212> PRT																
	<213> Triticum aestivum																
65	<400> 16																
	Val	Ala	Met	Pro	Gly	Arg	Arg	Phe	Arg	Leu	Thr	Tyr	Ala	Leu	Pro	Gly	
	1				5					10					15		
	Leu	Ile	Cys	Arg	Gly	Cys	Leu	Pro	Ala	His	Cys	Pro	Glu	His	Trp	Arg	
				20					25					30			
70	Asp	Ala	Asp	Asn	Ala	Arg	Val	Tyr	Arg	Asn	His	Arg	Leu	Asp	Val	Leu	
			35					40					45				

Gly Ala Ser Leu Arg Gly Glu Glu Glu Val Trp Ala Ala Asp Gly Cys  
 50 55 60  
 5 Ser Leu Leu Glu Gly Ala Ser Val Gly Pro Leu Ile Glu Leu Ala Ile  
 65 70 75 80  
 Asp Phe Asp Pro Ser Ile Leu Val Thr Gly Phe Val Gly Thr Ala Ile  
 85 90 95  
 10 Ala Phe Gly Cys Phe Ser Gly Ala Ala Ile Ile Ala Lys Arg Arg Glu  
 100 105 110  
 Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser Gly Leu Ser Ile Leu Leu  
 115 120 125  
 15 Trp Leu Gln Phe Ala Thr Ser Ile Phe Gly His Ser Ser Gly Ser Phe  
 130 135 140  
 20 Met Phe Glu Val Tyr Phe Gly Leu Leu Ile Phe Leu Gly Tyr Met Val  
 145 150 155 160  
 Tyr Asp Thr Gln Glu Ile Ile Glu Arg Ala His His Gly Asp Met Asp  
 165 170 175  
 25 Tyr Ile Lys His Ala Leu Thr Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala Val Leu  
 180 185 190  
 Val Arg Val Leu Ile Ile Leu Leu Lys Asn Ala Ala Asp Lys Val Gly  
 195 200 205  
 30 Gly Gln Glu Glu Glu Glu Glu Lys Ser  
 210 215  
 35  
 <210> 17  
 <211> 412  
 <212> DNA  
 <213> Zea mays  
 40  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (3)..(410)  
 <223> coding for BII-protein  
 45  
 <400> 17  
 tt gtt att gac ttg gat tcg agg att ctc gtc act gcg ttc gtc ggg 47  
 Val Ile Asp Leu Asp Ser Arg Ile Leu Val Thr Ala Phe Val Gly  
 1 5 10 15  
 50 acc gca gtt gct ttt gca tgc ttc tct ggc gct gcc atc atc gcc aag 95  
 Thr Ala Val Ala Phe Ala Cys Phe Ser Gly Ala Ala Ile Ile Ala Lys  
 20 25 30  
 55 cgc agg gaa tac ctg tac ctc ggc ggt ctg ctt tca tct ggc ctc tcc 143  
 Arg Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser Gly Leu Ser  
 35 40 45  
 60 att ctt ctc tgg ctg cag ttt gct act tca atc ttt ggc cac acc agc 191  
 Ile Leu Leu Trp Leu Gln Phe Ala Thr Ser Ile Phe Gly His Thr Ser  
 50 55 60  
 65 gcg acc ttc atg ttt gag ctc tac ttt ggc ctc ctg gtt ttc ctg gga 239  
 Ala Thr Phe Met Phe Glu Leu Tyr Phe Gly Leu Leu Val Phe Leu Gly  
 65 70 75  
 70 tat atg gtg ttt gac acc cag gag atc atc gag agg gcg cac cgt ggg 287  
 Tyr Met Val Phe Asp Thr Gln Glu Ile Ile Glu Arg Ala His Arg Gly  
 80 85 90 95  
 gac atg gac tac atc aag cac gcg ctg act ctc ttc acc gac ttt gtt 335  
 Asp Met Asp Tyr Ile Lys His Ala Leu Thr Leu Phe Thr Asp Phe Val  
 100 105 110

	gcg gtt ctt gtt cga atc ctt gtc atc atg atg aag aat gca cag gag	383
	Ala Val Leu Val Arg Ile Leu Val Ile Met Met Lys Asn Ala Gln Glu	
	115 120 125	
5	aaa tcc caa gac gag aag aag agg aag aa	412
	Lys Ser Gln Asp Glu Lys Lys Arg Lys	
	130 135	
10	<210> 18 <211> 136 <212> PRT <213> Zea mays	
15	<400> 18 Val Ile Asp Leu Asp Ser Arg Ile Leu Val Thr Ala Phe Val Gly Thr	
	1 5 10 15	
20	Ala Val Ala Phe Ala Cys Phe Ser Gly Ala Ala Ile Ile Ala Lys Arg	
	20 25 30	
25	Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser Gly Leu Ser Ile	
	35 40 45	
30	Leu Leu Trp Leu Gln Phe Ala Thr Ser Ile Phe Gly His Thr Ser Ala	
	50 55 60	
35	Thr Phe Met Phe Glu Leu Tyr Phe Gly Leu Leu Val Phe Leu Gly Tyr	
	65 70 75 80	
40	Met Val Phe Asp Thr Gln Glu Ile Ile Glu Arg Ala His Arg Gly Asp	
	85 90 95	
45	Met Asp Tyr Ile Lys His Ala Leu Thr Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala	
	100 105 110	
50	Val Leu Val Arg Ile Leu Val Ile Met Met Lys Asn Ala Gln Glu Lys	
	115 120 125	
55	Ser Gln Asp Glu Lys Lys Arg Lys	
	130 135	
60	<210> 19 <211> 345 <212> DNA <213> Triticum aestivum	
65	<220> <221> CDS <222> (1)..(342)	
70	<400> 19 gcc gcc atc atc gcc aag cgc agg gag tac ctg tac ctc ggt ggc ctg	48
	Ala Ala Ile Ile Ala Lys Arg Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu	
	1 5 10 15	
75	ctc tcc tcc ggc ctg tcg atc ctg ctc tgg ctg cag ttt gcc acg tcc	96
	Leu Ser Ser Gly Leu Ser Ile Leu Leu Trp Leu Gln Phe Ala Thr Ser	
	20 25 30	
80	atc ttt ggc cac tcc tct ggc agc ttc atg ttt gag gtt tac ttt ggc	144
	Ile Phe Gly His Ser Ser Gly Ser Phe Met Phe Glu Val Tyr Phe Gly	
	35 40 45	
85	ctg ttg atc ttt ctg gga tac atg gtg tac gac acg cag gag atc atc	192
	Leu Leu Ile Phe Leu Gly Tyr Met Val Tyr Asp Thr Gln Glu Ile Ile	
	50 55 60	
90	gag agg gcg cac cac ggc gac atg gac tac atc aag cac gcg ctc acc	240
	Glu Arg Ala His His Gly Asp Met Asp Tyr Ile Lys His Ala Leu Thr	

	65	70	75	80	
5	ctc ttc acc gac ttt gtc gcc gtc ctc gtc cgg atc ctc atc atc atg Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala Val Leu Val Arg Ile Leu Ile Ile Met	85	90	95	288
10	ctc aag aac gca ggc gac aag tcg gag gac aag aag aag agg aag agg Leu Lys Asn Ala Gly Asp Lys Ser Glu Asp Lys Lys Lys Arg Lys Arg	100	105	110	336
15	agg tcc tga Arg Ser				345
20	<210> 20 <211> 114 <212> PRT <213> Triticum aestivum				
25	Ala Ala Ile Ile Ala Lys Arg Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu 1 5 10 15				
30	Leu Ser Ser Gly Leu Ser Ile Leu Leu Trp Leu Gln Phe Ala Thr Ser 20 25 30				
35	Ile Phe Gly His Ser Ser Gly Ser Phe Met Phe Glu Val Tyr Phe Gly 35 40 45				
40	Leu Leu Ile Phe Leu Gly Tyr Met Val Tyr Asp Thr Gln Glu Ile Ile 50 55 60				
45	Glu Arg Ala His His Gly Asp Met Asp Tyr Ile Lys His Ala Leu Thr 65 70 75 80				
50	Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala Val Leu Val Arg Ile Leu Ile Ile Met 85 90 95				
55	Leu Lys Asn Ala Gly Asp Lys Ser Glu Asp Lys Lys Lys Arg Lys Arg 100 105 110				
60	Arg Ser				
65	<210> 21 <211> 403 <212> DNA <213> Zea mays				
70	<220> <221> CDS <222> (1)..(402) <223> coding for BII1-protein				
75	<400> 21 ggc agc atc gcc tgg ctc ttc tcg gtg ccc gtc tac gag gag agg aag Gly Ser Ile Ala Trp Leu Phe Ser Val Pro Val Tyr Glu Glu Arg Lys	5	10	15	48
80	agg tac tgg ctg ctg atg gcg gct gcc ctc ctg gaa ggg gcg tcg gtt Arg Tyr Trp Leu Met Ala Ala Leu Leu Glu Gly Ala Ser Val	20	25	30	96
85	gga ccc ctc atc aag ctc gcc gtg gaa ttt gac cca agc atc ctg gtg Gly Pro Leu Ile Lys Leu Ala Val Glu Phe Asp Pro Ser Ile Leu Val	35	40	45	144
90	aca gcg ttc gtg ggg act gcc att gcg ttc gcg tgc ttc tct tgc gcg Thr Ala Phe Val Gly Thr Ile Ala Phe Ala Cys Phe Ser Cys Ala	50	55	60	192

gcc atg gtg gcc aag cgc agg gag tac ctc tac ctg ggc ggg ctg ctc 240  
 Ala Met Val Ala Lys Arg Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Leu  
 65 70 75 80

5 tct tct ggc ctc tcc atc ctg ctc tgg ctg cag ttc gcc gcc tcc atc 288  
 Ser Ser Gly Leu Ser Ile Leu Leu Trp Leu Gln Phe Ala Ala Ser Ile  
 85 90 95

10 ttc ggc cac caa tcc act agc agc ttc atg ttt gag gtc tac ttt ggg 336  
 Phe Gly His Gln Ser Thr Ser Ser Phe Met Phe Glu Val Tyr Phe Gly  
 100 105 110

15 ctg ctc atc ttc ctg ggc tac atg gtg tac gac acg cag gag gtc atc 384  
 Leu Leu Ile Phe Leu Gly Tyr Met Val Tyr Asp Thr Gln Glu Val Ile  
 115 120 125

gag agg gcg cac cac ggc g 403  
 Glu Arg Ala His His Gly  
 130

20

<210> 22  
 <211> 134  
 <212> PRT  
 25 <213> Zea mays

<400> 22  
 Gly Ser Ile Ala Trp Leu Phe Ser Val Pro Val Tyr Glu Glu Arg Lys  
 1 5 10 15

30 Arg Tyr Trp Leu Leu Met Ala Ala Ala Leu Leu Glu Gly Ala Ser Val  
 20 25 30

35 Gly Pro Leu Ile Lys Leu Ala Val Glu Phe Asp Pro Ser Ile Leu Val  
 35 40 45

Thr Ala Phe Val Gly Thr Ala Ile Ala Phe Ala Cys Phe Ser Cys Ala  
 50 55 60

40 Ala Met Val Ala Lys Arg Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Leu  
 65 70 75 80

Ser Ser Gly Leu Ser Ile Leu Leu Trp Leu Gln Phe Ala Ala Ser Ile  
 85 90 95

45 Phe Gly His Gln Ser Thr Ser Ser Phe Met Phe Glu Val Tyr Phe Gly  
 100 105 110

50 Leu Leu Ile Phe Leu Gly Tyr Met Val Tyr Asp Thr Gln Glu Val Ile  
 115 120 125

Glu Arg Ala His His Gly  
 130

55

<210> 23  
 <211> 410  
 <212> DNA  
 60 <213> Zea mays

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (3)..(410)  
 65 <223> coding for B11-protein

<400> 23  
 gc tgg aac atc ggc gtg agg ctg aca atg ctc ggt tgc atc ggc agc 47  
 Trp Asn Ile Gly Val Arg Leu Thr Met Leu Gly Cys Ile Gly Ser  
 1 5 10 15

70 atc gac tgg ctc ttc tcg gtg ccc gtc tac gag gag agg aag agg tat 95  
 Ile Asp Trp Leu Phe Ser Val Pro Val Tyr Glu Glu Arg Lys Arg Tyr

20

	20	25	30	
5	ggg ctg ctg atg gcg gct gcc ctc ctg gaa ggc gct tcg gtc gga ccc Gly Leu Leu Met Ala Ala Ala Leu Leu Glu Gly Ala Ser Val Gly Pro	40	45	143
10	ctc gtc aag ctc gcc gtg gaa ttt gac cca agc atc ctg gtg acg gcg Leu Val Lys Leu Ala Val Glu Phe Asp Pro Ser Ile Leu Val Thr Ala	55	60	191
15	ttc gtg ggg act gcc atc gcg ttc gcg tgc ttc tcc ggc gcg gcc atg Phe Val Gly Thr Ala Ile Ala Phe Ala Cys Phe Ser Gly Ala Ala Met	70	75	239
20	gtg gcc agg cgc agg gag tac ctc tac ctg ggc ggg ctg ctc tcg tcg Val Ala Arg Arg Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser	85	90	287
25	ggg ctc tcc atc ctg ctc tgg ctg cag ctc gcc gcc tcc atc ttc ggc Gly Leu Ser Ile Leu Leu Trp Leu Gln Leu Ala Ala Ser Ile Phe Gly	100	105	335
30	cac tcc gca acc agc ttc atg ttc gag gtc tac ttc ggg ctg ctc atc His Ser Ala Thr Ser Phe Met Phe Glu Val Tyr Phe Gly Leu Leu Ile	115	120	383
35	ttc ctg ggc tac gtg gtg tac gac acg Phe Leu Gly Tyr Val Val Tyr Asp Thr	130	135	410
40	<210> 24 <211> 136 <212> PRT <213> Zea mays			
45	<400> 24 Trp Asn Ile Gly Val Arg Leu Thr Met Leu Gly Cys Ile Gly Ser Ile			
50	1 5 10 15 Asp Trp Leu Phe Ser Val Pro Val Tyr Glu Glu Arg Lys Arg Tyr Gly			
55	20 25 30 Leu Leu Met Ala Ala Ala Leu Leu Glu Gly Ala Ser Val Gly Pro Leu			
60	35 40 45 Val Lys Leu Ala Val Glu Phe Asp Pro Ser Ile Leu Val Thr Ala Phe			
65	50 55 60 Val Gly Thr Ala Ile Ala Phe Ala Cys Phe Ser Gly Ala Ala Met Val			
70	65 70 75 80 Ala Arg Arg Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser Gly			
	85 90 95 Leu Ser Ile Leu Leu Trp Leu Gln Leu Ala Ala Ser Ile Phe Gly His			
	100 105 110 Ser Ala Thr Ser Phe Met Phe Glu Val Tyr Phe Gly Leu Leu Ile Phe			
	115 120 125 Leu Gly Tyr Val Val Tyr Asp Thr			
	130 135			
70	<210> 25 <211> 463 <212> DNA <213> Triticum aestivum			
	<220> <221> CDS			

&lt;222&gt; (1)..(462)

&lt;223&gt; coding for BII-protein

<400> 25  
 5 ttc tca ggt acg ttc cgc aat tcc cgg agc gac gat ttc gtg ctc tgc 48  
 Phe Ser Gly Thr Phe Arg Asn Ser Arg Ser Asp Asp Phe Val Leu Cys  
 1 5 10 15  
 10 gaa ctt cag cga gag ctc ccc cga tgc cgg gac gca acc ttg acg gtc 96  
 Glu Leu Gln Arg Glu Leu Pro Arg Cys Arg Asp Ala Thr Leu Thr Val  
 20 25 30  
 15 gta tac gtg atc cca ata gtg ggc cga ata aaa tct gcc gcg ggt gct 144  
 Val Tyr Val Ile Pro Ile Val Gly Arg Ile Lys Ser Ala Ala Gly Ala  
 35 40 45  
 20 tac ctg cac att gcc ctg aac atc ggt ggg atg ctg aca atg ctt gcg 192  
 Tyr Leu His Ile Ala Leu Asn Ile Gly Gly Met Leu Thr Met Leu Ala  
 50 55 60  
 25 tgt atc gga acc att gcc tgg atg ttc tct gtg cca gtc tat gag gag 240  
 Cys Ile Gly Thr Ile Ala Trp Met Phe Ser Val Pro Val Tyr Glu Glu  
 65 70 75 80  
 30 agg aag agg ttt ggg ctg ctg atg ggt gca gcc ctc ctg gaa ggg gct 288  
 Arg Lys Arg Phe Gly Leu Leu Met Gly Ala Ala Leu Leu Glu Gly Ala  
 85 90 95  
 35 tcg gtt gga cct ctg att gag ctt gcc ata gac ttt gac cca agc atc 336  
 Ser Val Gly Pro Leu Ile Glu Leu Ala Ile Asp Phe Asp Pro Ser Ile  
 100 105 110  
 40 ctc gtg aca ggg ttt gtt gga acc gcc atc gcc ttt ggg tgc ttc tct 384  
 Leu Val Thr Gly Phe Val Gly Thr Ala Ile Ala Phe Gly Cys Phe Ser  
 115 120 125  
 45 ggc gcc gcc atc atc gcc aag cgc agg gag tac ctg tac ctc gga ggc 432  
 Gly Ala Ala Ile Ile Ala Lys Arg Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly  
 130 135 140  
 50 ctg ctc tcc tcc ggc ctg acg atc ctg ctc t 463  
 Leu Leu Ser Ser Gly Leu Thr Ile Leu Leu  
 145 150  
 <210> 26  
 <211> 154  
 <212> PRT  
 <213> Triticum aestivum  
 <400> 26  
 Phe Ser Gly Thr Phe Arg Asn Ser Arg Ser Asp Asp Phe Val Leu Cys  
 1 5 10 15  
 55 Glu Leu Gln Arg Glu Leu Pro Arg Cys Arg Asp Ala Thr Leu Thr Val  
 20 25 30  
 60 Val Tyr Val Ile Pro Ile Val Gly Arg Ile Lys Ser Ala Ala Gly Ala  
 35 40 45  
 65 Tyr Leu His Ile Ala Leu Asn Ile Gly Gly Met Leu Thr Met Leu Ala  
 50 55 60  
 70 Cys Ile Gly Thr Ile Ala Trp Met Phe Ser Val Pro Val Tyr Glu Glu  
 65 70 75 80  
 Arg Lys Arg Phe Gly Leu Leu Met Gly Ala Ala Leu Leu Glu Gly Ala  
 85 90 95  
 Ser Val Gly Pro Leu Ile Glu Leu Ala Ile Asp Phe Asp Pro Ser Ile  
 100 105 110  
 Leu Val Thr Gly Phe Val Gly Thr Ala Ile Ala Phe Gly Cys Phe Ser

115 120 125

Gly Ala Ala Ile Ile Ala Lys Arg Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly  
130 135 140

5 Leu Leu Ser Ser Gly Leu Thr Ile Leu Leu  
145 150

10 <210> 27  
<211> 388  
<212> DNA  
<213> Zea mays

15 <220>  
<221> CDS  
<222> (3)..(386)  
<223> coding for BII-protein

20 <400> 27  
tc tgg aac atc ggc ggg acg ctg aca atg ctc ggt tgc gtc ggc agc 47  
Trp Asn Ile Gly Gly Thr Leu Thr Met Leu Gly Cys Val Gly Ser  
1 5 10 15

25 atc gcc tgg ctc ttc tcg gtg ccc gtc tac gag gag agg aag agg tat 95  
Ile Ala Trp Leu Phe Ser Val Pro Val Tyr Glu Glu Arg Lys Arg Tyr  
20 25 30

30 ggg ctg ctg atg gcg gct gcc ctc ctg gaa ggc gct tcg gtc gga ccc 143  
Gly Leu Leu Met Ala Ala Ala Leu Leu Glu Gly Ala Ser Val Gly Pro  
35 40 45

35 ctc gtc aag ctc gcc gtg gaa ttt gac cca agc atc ctg gtg acg gcg 191  
Leu Val Lys Leu Ala Val Glu Phe Asp Pro Ser Ile Leu Val Thr Ala  
50 55 60

40 ttc gtg ggg act gcc atc gcg ttc gcg tgc ttc tcc ggc gcg cca tgg 239  
Phe Val Gly Thr Ala Ile Ala Phe Ala Cys Phe Ser Gly Ala Pro Trp  
65 70 75

45 tgg cag gcc agg gag tac ctc tac ctg ggc ggc tgc tct cgt cga ggc 287  
Trp Gln Ala Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Cys Ser Arg Arg Gly  
80 85 90 95

50 tct cca tcc tgc tct ggc tgc agc tcg ccg cct cca tct tcg gca ctc 335  
Ser Pro Ser Cys Ser Gly Cys Ser Ser Pro Pro Pro Ser Ser Ala Leu  
100 105 110

55 cgc aac agc ttc atg ttc gag gtc tac ttc ggg ctg ctc att ctt ctg 383  
Arg Asn Ser Phe Met Phe Glu Val Tyr Phe Gly Leu Leu Ile Leu Leu  
115 120 125

55 ggc ta 388  
Gly

60 <210> 28  
<211> 128  
<212> PRT  
<213> Zea mays

65 <400> 28  
Trp Asn Ile Gly Gly Thr Leu Thr Met Leu Gly Cys Val Gly Ser Ile  
1 5 10 15

Ala Trp Leu Phe Ser Val Pro Val Tyr Glu Glu Arg Lys Arg Tyr Gly  
20 25 30

70 Leu Leu Met Ala Ala Ala Leu Leu Glu Gly Ala Ser Val Gly Pro Leu  
35 40 45

Val Lys Leu Ala Val Glu Phe Asp Pro Ser Ile Leu Val Thr Ala Phe



50 55 60

Val Gly Thr Ala Ile Ala Phe Ala Cys Phe Ser Gly Ala Pro Trp Trp  
65 70 75 80

5 Gln Ala Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Cys Ser Arg Arg Gly Ser  
85 90 95

10 Pro Ser Cys Ser Gly Cys Ser Ser Pro Pro Pro Ser Ser Ala Leu Arg  
100 105 110

Asn Ser Phe Met Phe Glu Val Tyr Phe Gly Leu Leu Ile Leu Leu Gly  
115 120 125

15

<210> 29  
<211> 1737  
<212> DNA  
20 <213> Solanum tuberosum

<220>  
<221> promoter  
<222> (1)..(1737)  
25 <223> patatin promotor

<400> 29

30 aagcttatgt tgccatatag agtagtttgt gatgggtatcac ttcataaact ttaactttatg 60  
ttaaatttgt aatgataaaa tttttattgt aaattaaaaa ttactttataa aattgggcat 120  
tataacatat gaaagacaaa ttgtgtttaca ttttttactt ttgacttttaa tatgaatatt 180  
tcaattttaaa tcattgtttt attttctctt tcttttttaca ggtataaaaag gtgaaaattg 240  
aagcaagatt gattgcaagc tatgtgtcac cagtttattg atactttgga agaaattttt 300  
acttatatgt ctttgttttag gagtaaatatt tgatatgttt tagtttagatt ttcttgtcat 360  
ttatgcttta gtataatttt agttattttt attatatgat catgggtgaa ttttgataga 420  
35 aatatttttg tcattaaata aattaattta tcacaacttg attactttca gtgacaaaaa 480  
atgtattgtc gtagtacctc ttttgtttga atatgaataa ttttttttat tttgtgacaa 540  
ttgtaattgt cactacttat gataaatatt agtgacatat atgtcgtcgg taaaagcaaa 600  
cactttcagt gacaaaataa tagatttaat cacaaaatta ttaacctttt ttataataat 660  
aaattttatcc ctaattttata cattaagga caaagtattt tttttatata taaaaaatag 720  
40 tcttttagtga cgatcgtagt gttgagtcata gaaatcataa tgttgaatct agaaaaatct 780  
catgcagtgt aaaataaaacc tcaaaaagga cgttcagtc atagaggggg tgatatgtgac 840  
accccaacct cagcaaaaga aaacctccct tcaacaagga catttgcggg gctaaacaat 900  
ttcaagtctc atcacacata tttttattat ataatactaa taaagaatag aaaaggaaag 960  
45 gtaaacatca ttaaactgtc tttgtatatt tttagtga actgattgac gaaatctttt 1020  
tcgtcacaca aaatttttag tgacgaaaca tgatttatag atgatgaaat tatttgtccc 1080  
tcataatcta atttgttgta gtgatcatta ctctttgtt tgttttattt gtcattgttag 1140  
tccattaaaa aaaaatatct ctcttcttat gtacgtgaat ggttggaaac gatctattat 1200  
ataatactaa taaagaatag aaaaaggaaa gtgagtgagg ttcgaggagg agaactctgtt 1260  
50 taatatcaga gtgcgcatg tgtcaatttt atcgatatga ccctaacttc aactgagttt 1320  
aaccaattcc gataaggcga gaaatatcat agtattgagt ctgaaaaaat ctcatgtagt 1380  
gtggggtaaa cctcagcaag gacgttgagt ccatagaggg ggggtgtatgt gacaccccaa 1440  
cctcagcaaa agaaaacctc ccctcaagaa ggacatttgc ggtgctaaac aatttcaagt 1500  
ctcatcacac atatatatat attatataat actaataaat aatagaaaaa ggaaaggtaa 1560  
55 acatcactaa cgacagttgc ggtgcaaaact gagtgaggta ataaacatca ctaactttta 1620  
ttggttatgt caaactcaaa gtaaaatttc tcaacttggt tacgtgccta tatataccat 1680  
gcttgttata tgctcaaagc accaacaaaa tttaaaaaca ctttgaacat ttgcaaa 1737

60 <210> 30  
<211> 1317  
<212> DNA  
<213> Triticum aestivum

<220>  
<221> promoter  
<222> (1)..(1317)  
65 <223> germin 9f-3.8 gene promotor

<400> 30

70 gaattcaagc tatcactctc gaaccaagca cattgatgta aggtatcatt ggattccaga 60  
tgtcgtgagt tccaagttgc tgaaacttga gaagatccat accgacgaca atgggttcaga 120  
tatgatgacc aagatattgc gaaataagaa gctacaagca tgttgcaagg tagcgggcat 180  
ggcgggtgcc ccatcatgag tccggaggggg agatttggtt ggatatacctc ctcatgtggg 240



&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: recombinant  
expression vector pUbiBI-1

5

<400> 33  
ggggatcctc tagagtcgac ctgcaggcgg ccgcactagt gattaggatt ccaacgcgag 60  
ccaggacaag cgaggaacct tgcgtgcgag gcgaggccgc cccgctccga ttcgattcga 120  
10 cgcgaggcgg caggcgaggg gatggacgcc ttctactcga cctcgtcggc ggcgggcagc 180  
ggctggggcc acgactccct caagaacttc cgccagatct ccccgccggt gcagtcacc 240  
ctcaagctcg tttacctgac tctatgcttt gcactggcct catctgccgt ggggtgcttac 300  
ctacacattg cctgaacat cggcggggat ctgacaatgc tcgcttggtg cggaactatc 360  
gcttgatgtg tctcgggtgc agtctatgag gagaggaaga ggtttgggct gctgatgggt 420  
15 gcagccctcc tgggaagggg ttcgggttga cctctgattg agcttgccat agactttgac 480  
ccaagcatcc tcgtgacagg gtttggctgg accgccatcg cctttgggtg cttctctggc 540  
gccgccatca tcgccaaagc caggggagtag ctgtacctcg gtggcctgct ctcgtctggc 600  
ctgtcgatcc tgcctcgggt gcagtttgtc acgtccatct ttggccactc ctctggcagc 660  
ttcatgtttg aggtttactt tggcctgttg atcttcctgg ggtacatggg gtacgacagc 720  
20 caggagatca cctgagaggc gcacctggg gcagtcctca tcatcatgct caagaacgca 840  
ctcttcaccg actttgttgc cgtcctcgtc cgagtcctca tcatcatgct caagaacgca 840  
ggcgacaagt cggaggacaa gaagaagagg aagagggggt cctgaacgtw tctcccgac 900  
atgtagatac cgtcaccgcg tcgacctgca ggcactgccg ctgaaatcac cagtctctct 960  
25 ctacaaatct atctctctca taataatgtg tgagtgttc ccagataagg gaattagggt 1020  
tcttataggg tttcgtctcat gtgttgagca tataagaaac ccttagtatg tatttgtatt 1080  
tgtaaaatc tctatcaat aaaatttcta attcctaaaa ccaaaatcca gtgggtaccg 1140  
agctcgaatt caagcttggc actggccgct gttttacaac gtcgtgactg ggaaaaccct 1200  
ggcgttacc cacttaatcg ccttgacgca catccccct tcgccagctg gcgtaatagc 1260  
gaagaggccc gcaccgatcg cccttcccaa cagttgcgca gcctgaatgg cgaatggcgc 1320  
30 ctgatgcggg attttctcct tacgcatctg tgcgggtatt cacaccgcat atggtgcact 1380  
ctcagtagaa cctgctctga tgcgcgatg ttaagccagc cccgacaccc gccaaacacc 1440  
gctgacgcgc cctgacggg tgtctgctc ccggcatccg cttacagaca agctgtgacc 1500  
gtctccggga gctgcatgtg tcagaggttt tcaccgtcat caccgaaacg cgcgagacga 1560  
aagggcctcg tgatacgctt atttttatag gttaatgtca tgataataat ggtttcttag 1620  
35 acgtcagggt gcacttttct gggaaatgtg ccggaaccc cctatttgtt atttttctaa 1680  
atacattcaa atatgtatcc gctcatgaga gctcatgaga gataaatgct tcaataatat 1740  
tgaaaaagga agagtatgag tattcaacat ttccgtgtcg cccttattcc cttttttgcg 1800  
gcatttttgc ttctgttttt tgctcaccca gaaacgctgg tgaaagttaa agatgctgaa 1860  
gatcagttgg gtgcacgagt ggggttacat gaactggatc tcaacagcgg taagtctctt 1920  
40 gagagttttc gcccggaaga acgttttcca atgatgagca cttttaaagt tctgctatgt 1980  
ggcgcggtat tatcccgat tgacgcgggg caagagcaac tcgggtcgccg catacactat 2040  
tctcagaatg acttggttga gtactcacca gtcacagaaa agcatcttac ggtggcctg 2100  
acagtaagag aattatgcag tgcctgcata accatgagtg atagactgga aactggcgaa 2160  
45 cttctgacaa cgatcggagg accgaaggag ctaaccgctt ttttgacaaa catgggggat 2220  
catgtaactc gccttgatcg ttgggaaccg gagctgaatg aagccatacc aaacgacgag 2280  
cgtgacacca cgatgcctgt agcaatggca acaacgttgc gcaactatt aactggcgaa 2340  
ctacttactc tagcttcccg gcaacaatta atagactgga tggaggcgga taaagttgca 2400  
ggaccaactc tgcgtcggc ccttcgggct ggctgggtta ttgctgataa atctggagcc 2460  
50 ggtgagcgtg ggtctcggg tatcattgca gcaactatgg atgaacgaaa tagacagatc 2520  
atcgtagtta tctacacgac ggggagtcag gcaactatgg atgaacgaaa tagacagatc 2580  
gctgagatag gtgcctcact gattaagcat tggtaactgt cagaccaagt ttactcatat 2640  
atactttaga ttgatttaaa acttcatttt taatttaaaa ggatctaggt gaagatcctt 2700  
tttgataatc tcatgaccaa aatcccttaa cgtgagtttt cgttccactg agcgtcagac 2760  
55 cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga gatccttttt ttctgcgctg aatctgctgc 2820  
ttgcaaacaa aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttgtt tgcgggatca agagctacca 2880  
actcttttcc cgaaggtaac tggcttcagc agagcgcaga taccaaatac tgttcttcta 2940  
gtgtagccgt agttaggcca ccacttcaag aactctgtag caccgcctac atacctcgct 3000  
ctgctaattc tgttaccagt ggctgctgac agtggcgata agtcgtgtct taccgggttg 3060  
gactcaagac gatagttacc ggataaggcg cagcggtcgg gctgaacggg ggggtcgtgc 3120  
60 acacagccca gcttggagcg aacgacctac accgaactga gatacctaca gcgtgagctt 3180  
tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaac ggtatccggt aagcggcagg 3240  
gtcggaaacg gagagcgcac gaggagctt cgtcgatttt tgtgatgtct gtcagggggg 3300  
cctgtcgggt ttgccacct ctgacttgag cgtcgatttt ggttccctggc cttttgctgg 3360  
65 cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg gcctttttac ggttccctgct ctgtggataa ccgtattacc 3420  
ccttttgcct acatgttctt tctcgtgata tccccgtatt agccgacgag cagagtcagg 3480  
gcctttgagt gagctgatac cgtcgcgcgc aaacgcgctc tccccgcgag ttggccgatt 3540  
agcgaggag cggaagagcg cccaatacgc gaactggaaag cgggcagtag gcgcaacgca 3600  
cattaatgca gctggcacga caggtttccc gactggaaag cgggcagtag gcgcaacgca 3660  
70 attaatgtga gtttagctcac tcattaggca cccagggctt tacactttat gcttccggct 3720  
cgtatgttgt gtggaattgt gagcggataa caatttcaca caggaaacag ctatgacctat 3780  
gattacgaat tcccatgcct cagaggatcta acatgcttag atacatgaag taacatgctg 3840  
ctacggttta ataattcttg agttgatttt tactggtact tagatagatg tatatacatg 3900  
cttagataca tgaagtaaca tgcctctaca gttcctttta tcattattga gtacctatat 3960

attctaataa atcagtatgt tttaaattat tttgatttta ctggtactta gatagatgta 4020  
 tatatacatg ctcaaacatg cttagatata tgaagtaaca tgctgctacg gtttagtcat 4080  
 tattgagtgc ctataatttc taataaatca gtatgtttta aattattttg attttactgg 4140  
 5 tacttagata gatgtatata tacatgctca aacatgctta gatacatgaa gtaatatgct 4200  
 actacgggttt aattgttctt gagtacctat atatttcta aaatcagtat gtttttaatt 4260  
 atttcgattt tactggtact tagatagatg tatatataca tgcttagata catgaagtaa 4320  
 catgctacta cgggttaatt gttcttgaat acctatata tctaataaat cagtatgttt 4380  
 taaattattt cgattttact ggtacttaga tagatgtata tatacatgct cgaacatgct 4440  
 10 tagatacatg aagtaacatg ctacatatat attataataa atcagtatgt cttaaattat 4500  
 tttgattttta ctggtactta gatagatgta tatacatgct caaacatgct tagatacatg 4560  
 aagtaacatg ctactacggt ttaatcatta ttgagtacct atatatctta ataaatcagt 4620  
 atgttttcaa ttgttttgat tttactggta cttagatata tgtatatata catgctcgaa 4680  
 catgcttaga tacgtgaagt aacatgctac tatgggttaatt tggtcttgag tacctatata 4740  
 15 ttctaataaaa tcagtatggt ttaaattatt tcgattttac tgggtacttag atagatgtat 4800  
 atatacatgc tcgaacatgc ttagatacat gaagtaacat gctactacgg tttaatcggt 4860  
 cttgagtacc tataatctcag tatgtcttaa attatcttga ttttactgggt 4920  
 acttagatag atgtatatac atgcttagat acatgaagta acatgctact atgatttaatt 4980  
 cggtcttgag tacctatata ttctaataaa tcagtatggt tttaattatt ttgattttac 5040  
 20 tggtagcttag atagatgtat atatacatgc tcgaacatgc ttagatacat gaagtaacat 5100  
 gctactacgg tttaatcatt cttagatcct tataatattct aataaatcag tatgttttta 5160  
 attattttga tattactgggt acttaacatg tttagatata tcatatagca tgcacatgct 5220  
 gctactggtt aatcattcgt gaatacctat atatttcta atatcagtat gtcttcta 5280  
 tattatgatt ttgatgtact tgtatgggtg catatgctgc agctatgtgt agattttgaa 5340  
 25 taccagtggt gatgagcatg catggcgct tcatagttca tatgctgttt atttccttg 5400  
 agactgttct tttttgttga tagtcacct gttgtttggt gattcttatg ccccc 5455

&lt;210&gt; 34

&lt;211&gt; 12633

30 &lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

35 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: recombinant  
 expression vector pLo114UbiBI-1

&lt;400&gt; 34

aattcactgg ccgctggtttt acaacgactc agagcttgac aggaggcccg atctagtaac 60  
 40 atagatgaca ccgcgcgcga taatttatcc tagtttgccg gctatatattt gttttctatc 120  
 gcgtattaaa tgtataattg cgggactcta atcataaaaa cccatctcat aaataacgctc 180  
 atgcattaca tgttaattat tacatgctta acgtaattca acagaaatta tatgataac 240  
 atcgcaagac cggcaacagg attcaatctt aagaaacttt attgccaaat gtttgaacga 300  
 45 tcggggatca tccgggtctg tggcgggaac tccacgaaaa tatccgaacg cagcaagatc 360  
 tagagcttgg gtcccgctca gaagaactcg tcaagaaggc gatagaaggc gatgcgctgc 420  
 gaatcggggc cggcgatacc gtaaagcacg aggaagcggg cagcccatc gccgccaagc 480  
 50 tcttcagcaa tatcacgggt agccaacgct atgtcctgat agcggtcgcg cacaccagc 540  
 cggccacagt cgatgaatcc agaaaagcgg ccattttcca ccatgatatt cggcaagcag 600  
 gcatcgccat gggtcacgac gagatcctcg ccgtcgggca tgcgcgcctt gagcctggcg 660  
 aacagttcgg ctggcgcgag cccctgatgc tcttcgtcca gatcatcctg atcgacaaga 720  
 55 cggcttcca tccgagtacg tgctcgctcg atgcagcgc cgcattgcat cagccatgat ggatactttc 840  
 caggtagccg gatcaagcgt atgcagcgcg cgcattgcat cagccatgat ggatactttc 840  
 tcggcaggag caaggtgaga tgacaggaga tccctgcccg gcacttcgac caatagcagc 900  
 cagtccttcc cgcgttcagt gacaacgctg agcacagctg cgcaaggaaac gccgctcgtg 960  
 60 gccagccacg atagccgcgc tgcctcgtcc tgcagttcat tcagggcacc ggacaggtcg 1020  
 55 gtcttgacaa aaagaaccgg gcgcccctgc gctgacagcc ggaacacggc ggcacagag 1080  
 cagccgattg tctgttgtgc ccagtcacg ccgaatagcc tctccacca agcggccgga 1140  
 gaacctgcgt gcaatccatc ttgttcaatc atgcgaaacg atccagatcc ggtgcagatt 1200  
 65 atttgattg agagtgaata tgagactcta attggatacc gaggggaatt tatggaacgt 1260  
 cagtggagca tttttgacaa gaaatatttg cttagctgata gtgaccttag gcgacttttg 1320  
 60 aacgcgcaat aatggtttct gacgtatgtg cttagctcat taaactccag aaaccgcggc 1380  
 ctgagtggct ccttcaacgt tgcggttctg tcagttccaa acgtaaaacg gcttgctccg 1440  
 65 gtcacgcgc gggggtcata acgtgactcc cttaattctc cgctcatgat cagattgtcg 1500  
 tttcccgcct tcagttttaa ctatcagtgt ttgacaggat cctgcttggg aataattgtc 1560  
 attagattgt ttttatgcat agatgcactc gaaatcagcc aatttttagac aagtatcaaa 1620  
 70 cggatgttaa ttcagtacat taaagacgct cgcaatgtgt tattaagttg tctaagcgtc 1680  
 aattgtttta caccacaata tatcctgcca ccagccagcc aacagctccc cgaccggcag 1740  
 ctgggcacaa aatcaccacg cgttaccacc ccgcggccg gccgcatggt gttgaccgtg 1800  
 ttgcgcggca ttgcccaggt cgagcgttcc ctaatcatcg accgcaccg gagcgggcgc 1860  
 gaggcgcgca agggccgagg cgtgaagttt ggcccccgcc ctaccctcac cccggcacag 1920  
 atgcgcgacg cccgcgagct gatcgaccag gaaggccgca ccgtgaaaga ggcggctgca 1980  
 ctgcttggcg tgcacgctc gacctgtac cgcgcacttg agcgcagcga ggaagtgcag 2040  
 cccaccgagg ccaggcggcg cgggtgccttc cgtgaggacg cattgaccga ggccgacgac 2100  
 ctggcggccg ccgagaatga acgccaagag gaacaagcat gaaaccgcac caggacggcc 2160

	aggacgaacc	gttttttcatt	accgaagaga	tcgaggcgga	gatgatcgcg	gcccgggtacg	2220
	tgttcgagcc	gcccgcgcac	gtctcaaccg	tgccgctgca	tgaaatcctg	gcccggtttgt	2280
	ctgatgccaa	gctggcgcc	tgcccgcca	gcttgccgc	tgaagaaacc	gagcgccgc	2340
5	gtctaaaaag	gtgatgtgta	tttgagtaaa	acagcttgcg	tcattcggtc	gctgcgtata	2400
	tgatgcgatg	agtaaaataaa	caaatacgca	aggggaacgc	atgaagggtta	tcgctgtact	2460
	taaccagaaa	ggcgggtcag	gcaagacgac	catcgcaacc	catctagccc	gcgccctgca	2520
	actcgccggg	gcccgatgttc	tgtttagtca	ttccgatccc	cagggcagtg	cccgcgattg	2580
	ggcgagcgtg	cggaagatc	aaccgctaac	cgttgctggc	atcgaccgcc	cgacgattga	2640
10	ggcgagcgtg	aaggccatcg	gcccggcgca	cttcgtagt	atcgacggag	cgccccaggc	2700
	ggcgacttg	gctgtgtccg	cgatcaaggc	agccgacttc	gtgctgattc	cggtgcagcc	2760
	aagcccttac	gacatatggg	ccaccgccc	cctggtggag	ctggttaagc	agcgattga	2820
	ggtcaccgat	ggaaggctac	aagcggcctt	tgctgtgtcg	cgggcgatca	aaggcacgca	2880
	catcgccgtg	gaggttgccg	agggctggc	aggttacgag	ctgcccattc	ttgagtcgcc	2940
15	tatcacgcag	cgctgagct	accagggcac	tgccgcgcgc	ggcacaaccg	ttcttgaatc	3000
	agaaccgcag	ggcgacgctg	cccgcgaggt	ccagggcgtg	gcccgtgaaa	ttaaatcaaa	3060
	actcatttga	gttaatgagg	taaagagaaa	atgagcaaaa	gcacaaacac	gctaatgccc	3120
	ggcgttcgga	gcgacgcag	cagcaaggc	gcaacgttgg	ccagcctggc	agacacgcca	3180
	gccatgaagc	gggtcaactt	tcagttgccg	gcccaggatc	acaccaagct	gaagatgtac	3240
	gcggtacgcc	aaggcaagac	cattaccgag	ctgctatctg	aatacatcgc	gcagctacca	3300
20	gagtaaatga	gcaaatgaat	aaatgagtag	atgaatttta	gcggctaaag	gagggcagcc	3360
	ggaaaatcaa	gcaaacaccg	gcaccgacgc	cgtggaatgc	cccatgtgtg	gaggaacggg	3420
	cggttgccca	ggcgtaagcg	gctgggttgt	ctgcccggcc	tgcaatggca	ctggaacccc	3480
	caagcccagag	gaatcggcgt	gagcgttcgc	aaaccatccg	gcccgggtaca	aatcggcgcg	3540
25	gcgctgggtg	atgacctggg	ggagaagtgc	aagccgcgcg	agggccgccca	gcggcagccg	3600
	atcgaggcag	agcacgccc	cggtgaatcg	tggaagcgcg	ccgctgatcg	aatccgcaaa	3660
	gaatcccggc	aaccgcccgc	agccggtgcg	ccgtcgatta	ggaagccgcc	caagggcgac	3720
	gagcaaccag	attttttctg	tccgatgtct	tatgacgtgg	gcacccgcga	tagtcgcagc	3780
	atcatggacg	tgccggtttt	cgtctgtctg	aagcgtgacc	gacgagctgg	cgaggtgac	3840
	gcctacgagc	ttccagacgg	gcacgtagag	gtttccgcag	ggcggcgccg	catggccagt	3900
30	gtgtgggatt	acgacctggg	actgatggcg	gtttcccatc	taaccgaatc	catgaaccga	3960
	taccgggaag	ggaagggaga	caagcccggc	cgctgtttcc	gtccacacgt	tgccgacgta	4020
	ctcaagttct	gcccgcgagc	cgatggcgga	aagcagaaa	acgacctggg	cgaaacattc	4080
	attcgggttaa	acaccacgca	cgttgccatg	cagcgtacga	agaaggccaa	gaacggccgc	4140
	ctggtgacgg	tatccgaggg	tgaagccttg	attagccgct	acaagatcgt	aaagagcgaa	4200
35	accggggcgg	cggagtacat	cgagatcgag	ctagctgatt	ggatgtaccg	cgagatcaca	4260
	gaaggcaaga	acccggacgt	gctgacgggt	ctagccgatt	actttttgat	cgatcccggc	4320
	atcgcccggt	ttctctaccg	cctggcacgc	cgccgcgcag	gcaaggcaga	agccagatgg	4380
	ttgttcaaga	cgatctacga	acgcagtggc	agccgcggag	agttcaagaa	gttctgtttc	4440
	accgtgcgca	agctgatcgg	gtcaaatgac	ctgcccggag	acgatttgaa	ggaggaggcg	4500
40	gggcaggctg	gcccgatcct	agtcagtcgc	taccgcaacc	tgatcgaggg	cgatcccgcc	4560
	gcccgttcct	aatgtacgga	gcagatgcta	gggcaaatg	ccctagcagg	ggaaaaaggt	4620
	cgaaaaggct	tctttcctgt	ggatagcacg	tacattggga	acccaaagcc	gtacattggg	4680
	aaccggaaac	cgtacattgg	gaacccaaag	ccgtacattg	ggaaccggtc	acacatgtaa	4740
45	gtgactgata	taaaagagaa	aaaaggcggt	ttttccgctt	aaaactcttt	aaaacttatt	4800
	aaaactctta	aaaccgcgct	ggcctgtgca	taactgtctg	gccagcgcac	agccgaagag	4860
	ctgcaaaaag	cgctacacct	tcggctcgctg	cgctccctac	gccccgcgcg	ttcgctcggt	4920
	cctatcgccg	ccgctggcgc	ctcaaaaatg	gctggcctac	ggccaggcaa	tctaccaggg	4980
	cgccgacaag	ccgcgcgcgc	gccactcgac	cgccggcgcc	cacatcaagg	caccctgcct	5040
50	cgccgctttc	ggtgatgacg	gtgaaaacct	ctgacacatg	cagctcccgg	agacgggtac	5100
	agcttgctctg	taagcggatg	ccgggagcag	acaagccggt	cagggcgcggt	cagcggtgtg	5160
	tgggcggtgt	cggggagcag	ccatgaccca	gtcacgtagc	gatagcggag	gtgtgaaata	5220
	cttaactatg	cgcatcaga	ccagattgta	ctgagatgac	accatatcgg	gtgtgaaata	5280
	ccgcacagat	gcgtaaggag	aaaataccgc	atcaggcgct	cttcgcttcc	ctcgctcact	5340
	gactcgctgc	gctcggtcgt	tcggctgcgg	cgagcggtat	cagctcactc	aaaggcggtg	5400
55	atacggttat	ccacagaatc	aggggataac	gcaggaaaaga	acatgtgagc	aaaaggccag	5460
	caaaaggcca	ggaaccgtaa	aaaggccgcg	ttgctggcgt	ttttccatag	gctccgcccc	5520
	cctgacgagc	atcacaaaaa	tcgacgctca	agtcagaggt	ggcgaaaacc	gacaggacta	5580
	taaagatacc	aggcgtttcc	ccctggaagc	tccctcgctg	gctctcctgt	tccgacctg	5640
	ccgcttacgc	gatacctgtc	cgcttctctc	ccttcgggaa	gcgtggcgct	ttctcatagc	5700
60	tcacgctgta	ggtatctcag	ttcggtgtag	gtcgcttcgct	ccaagctggg	ctgtgtgcac	5760
	gaaccccccg	ttcagcccga	ccgctgcgcg	ttatccggta	actatcgctc	tgagtcacac	5820
	ccggttaagac	acgacttatc	gccactggga	gagccactg	gtaacaggat	tagcagagcg	5880
	aggatagtag	gcggtgtctg	agagtctctg	aagtggtggc	ctaaactacg	ctacactaga	5940
	aggacagtag	ttggtatctg	cgctctgctg	aagccagttg	ccttcggaaa	aagagttggg	6000
65	agctcttgat	ccggcaaaaca	aaccaccgct	ggtagcgggtg	gtttttttgt	ttgcaagcag	6060
	cagattacgc	gcagaaaaaa	aggatctcaa	gaagatcctt	tgatcttttc	tacggggtct	6120
	gacgtctcag	ggaacgaaaa	ctcacgttaa	ggatcttttg	tcattgcatga	tatatctccc	6180
	aatttgtgta	gggcttatta	tgacgcgtta	aaaataataa	aagcagactt	gacctgatag	6240
	tttggtctgtg	agcaattatg	tgcttagtgc	atctaaccgt	tgagtttaagc	cgccgcgcga	6300
70	agcggcgctg	gcttgaacga	atctctagct	agacattatt	tgccgactac	cttggtgatc	6360
	tcgcctttca	cgtagtggac	aaattcttcc	aactgatctg	cgccgcgaggc	caagcgatct	6420
	tcttcttctg	caagataagc	ctgtctagct	tcaagtatga	cggtctgata	ctgggcccgc	6480
	aggcgctcca	ttgcccgatc	ggcagcgaca	tccttcggcg	cgattttgcc	ggttactgcg	6540

	ctgtacaaaa	tgcgggacaa	cgtaagcact	acatttcgct	catcgccagc	ccagtcgggc	6600
	ggcgagttcc	atagcggttaa	ggttttcattt	agcgccctcaa	atagatcctg	ttcaggaacc	6660
	ggatcaaaga	gttcctccgc	cgctggacct	accaaggcaa	cgctatgttc	tcttgctttt	6720
5	gtcagcaaga	tagccagatc	aatgtcgcag	gtggctggct	cgaagatacc	tgcaagaatg	6780
	tcattgcgct	gccattctcc	aaattggcagt	tcgcgccttag	ctggataacg	ccacggaatg	6840
	atgtcgtcgt	gcacaacaat	ggtagacttct	acagcgcgga	gaatctcgct	ctctccaggg	6900
	gaagccgaag	tttccaaaag	gtcgttgatc	aaagctcgcc	gcgttggttc	atcaagcctt	6960
	acgggtcaccg	taaccagcaa	atcaatatca	ctgtgtggct	tcaggccgccc	atccactgcg	7020
10	gagccgtaca	aatgtacggc	cagcaacgctc	ggttcgagat	ggcgctcgat	gacgccaact	7080
	acctctgata	gttgagtcga	tacttcggcg	atcaccgctt	ccccatgat	gtttaacttt	7140
	gttttagggc	gactgccctg	ctgcgttaaca	tcgttgctgc	tcataacat	caaacatcga	7200
	cccacggcgt	aacgcgcttg	ctgcttggtg	gcccagggca	tagactgtac	ccccaaaaaa	7260
	cagtcataac	aagcatgaa	aaccgcgact	gcggggggttc	catggacata	caaatggacg	7320
15	aacggataaa	ccttttcacg	cccttttaaa	tatccgatta	ttctaataaa	cgctcttttc	7380
	tcttaggttt	acccgccaat	atatcctgtc	aaacactgat	agttttaaact	gaaggcgagg	7440
	aacgacaatc	agatctagta	ggaaacagct	atgaccatga	ttacgccaaag	cttgcatgcc	7500
	tgacggctga	ctctagagga	tcgatccccg	tccttatgt	tacgtcctgt	7560	
	agaaacccca	acccgtgaaa	tcaaaaaact	cgacggcctg	tgggcattca	gtctggcattg	7620
20	cgaaaactgt	ggaattgggtc	agcgttggtg	ggaaagcgcg	ttacaagaaa	gccggggcaat	7680
	tgctgtgcca	ggcagtttta	acgatcagtt	cgccgatgca	gatattcgta	attatgcggg	7740
	caacgtctgg	tatcagcgcg	aagtctttat	accgaaaggt	tgggcaggcc	agcgtatcgt	7800
	gctgcgtttc	gatgcgggtca	ctcattacgg	caaagtgtgg	gtcaataatc	aggaagtgat	7860
	ggagcatcag	ggcgggtata	cgccatttga	agccgatgtc	acgccgatag	ttattgcccg	7920
25	gaaaagtgtg	cgtaagtttc	tgcttctacc	tttgatatat	atataataat	tatcattaat	7980
	tagtagtaat	ataatatattc	aaatatattt	ttcaaaaata	aagaatgtag	tatatagcaa	8040
	ttgcttttct	gtagtttata	agtgtgtata	ttttaattta	taacttttct	aatatatgac	8100
	caaaatattgt	tgatgtgcag	gtatcaccgt	ttgtgtgaac	aacgaactga	actggcagac	8160
	tatcccgcgc	ggaatgggtga	ttaccgcagc	aaacggcaag	aaaaagcagt	cttacttcca	8220
30	tgattttctt	aactatgccg	gaatccatcg	cagcgtaatg	ctctacacca	cgccgaacac	8280
	ctgggtggac	gatatcaccg	tggtgacgca	tgctcgcgcaa	gactgtaacc	acgcgtctgt	8340
	tgactggcag	gtgggtggcca	atgggtgatgt	cagcggtgaa	ctgcgtgatg	cggatcaaca	8400
	gggtggttga	actggacaag	gcactagcgg	gactttgcaa	gtgggtgaatc	gcacactctg	8460
	gcaaccgggt	gaaggttatc	ttctatgaat	gtgcgtcaca	gccaaaagcc	agacagagtg	8520
35	tgatatctac	ccgcttcgcg	tcggcatccg	gtcagtgcca	gtgaaggcg	aacagttcct	8580
	gattaaccac	aaaccgttct	actttactgg	ctttggctcg	catgaagatg	cggacttgcg	8640
	tggaacaagg	ttcgataacg	tgctgatggg	gcacgaccac	gcattaatgg	actggattgg	8700
	ggccaactcc	taccgtacct	cgcattaccc	ttacgctgaa	gagatgctcg	actgggcaga	8760
	tgaacatggc	atcgtggtga	ttgatgaaac	tgctgctgtc	ggctttaacc	tctctttagg	8820
40	cattggtttc	gaagcgggca	acaagccgaa	agaactgtac	agcgaagagg	cagtcaacgg	8880
	ggaaactcag	caagcgcact	tacaggcgat	taaagagctg	atagcgcggtg	acaaaaacca	8940
	cccaagcggtg	gtgatgtgga	gtattgcca	cgaaccggat	accggtccgc	aaggtgcacg	9000
	ggaatatttc	gcgccactgg	cggaagcaac	gcgtaaactc	gacccgacgc	gtccgatcac	9060
	ctgcgtcaat	gtaatgttct	gcgacgctca	caccgatacc	atcagcgatc	tctttgatgt	9120
45	gctgtgcctg	aaccgttatt	acggatggta	tgctccaaagc	ggcgattttg	aaacggcaga	9180
	gaagggtactg	gaaaaagaac	ttctggcctg	gcaggagaaa	ctgcatcagc	cgattatcat	9240
	caccgaatac	ggcgtggata	cgtagccgg	gctgcactca	atgtacaccg	acatgtggag	9300
	tgaagagtat	cagtgtgcat	ggctggatat	gtatcaccgc	gtctttgatc	gcgtcagcgc	9360
	cgctcgtcgt	gaacagggtat	ggaatttcgc	cgattttgcg	acctcgcaag	gcatattggc	9420
50	cggtggcggt	aacaagaaag	ggatcttcac	tcgcgaccgc	aaaccgaagt	cggcggtttt	9480
	ctgtgtgcaa	aaacgctgga	ctggcatgaa	cttcggtgaa	aaaccgcagc	agggaggcaa	9540
	acaatgagag	ctcgaatttc	cccgatcggt	caaacatttg	gcaataaagn	ttcttaagat	9600
	tgaatcctgt	tgccggttct	gcgatgatta	tcatataatt	tctgttgaat	tacgttaagc	9660
	atgtaataat	taacatgtaa	tgcatgacgt	tatttatgag	atgggttttt	atgattagag	9720
55	tcccgcaatt	atacatttaa	tacgcgatag	aaaacaaaat	atanccgcga	aactaggata	9780
	aattatcgcg	cgcggtgtca	tctatgttac	tagatcgggg	attcccatgc	ctcgaggatc	9840
	taacatgctt	agatacatga	agtaacatgc	tgctacgggt	taataattct	tgagttgatt	9900
	tttactggta	cttagataga	tgtatataca	tgcttagata	catgaagtaa	catgctccta	9960
	cagttccctt	aatcattatt	gagtacctat	atattctaat	aaatcagtat	gttttaaat	10020
60	attttgattt	tactgggtact	tagatagatg	tatatataca	tgctcaaaaca	tgcttagata	10080
	catgaagtaa	catgctgcta	cggttttagt	attattgagt	gctataaatt	tctaataaatt	10140
	cagtatgttt	taaattattt	tgattttact	ggtacttaga	tagatgtata	tatacatgct	10200
	caaacatgct	tagatacatg	aagtaatatg	ctactacggg	tttaattgttc	ttgagtacct	10260
	atataattca	ataaatcagt	atgttttaaa	ttatttctgat	tttactggta	cttagataga	10320
65	tgatatata	catgcttaga	tacatgaagt	aacatgctac	tacgggtttta	ttgttcttga	10380
	atacctatat	attctaataa	atcagtatgt	tttaaatatt	ttcgatttta	ctgggtactta	10440
	gatagatgta	tatatacatg	ctcgaacatg	cttagatata	tgaagtaaca	tgctacatat	10500
	atattataat	aaatcagtat	gtcttaaaat	atgttgattt	tactgggtact	tagatagatg	10560
	tatatacatg	ctcaaacatg	cttagatata	tgtaagtaaca	tgctactacg	gttttaatcat	10620
70	tattgagtag	ctatatattc	taataaatca	gtatgttttc	aattgttttg	attttactgg	10680
	tacttagata	tatgtatata	tacatgctcg	aacatgctta	gatacgtgaa	gtaacatgct	10740
	actatgggta	attgttcttg	agtacctata	tattcttaata	aatcagtatg	tttttaaat	10800
	tttcgatttt	actgggtactt	agatagatgt	atatatacat	gctcgaacat	gcttagatag	10860
	atgaagtaac	atgctactac	ggtttaatcg	ttcttgagta	cctatatatt	ctaataaatc	10920



5 agtatgtctt aaattatctt gattttactg gtacttagat agatgtatat acatgcttag 10980  
 atacatgaag taacatgcta ctatgattta atcggttcttg agtacctata tattctaata 11040  
 aatcagtagt tttttaatta ttttgatttt actgggtactt agatagatgt atatatacat 11100  
 gctcgaacat gcttagatac atgaagtaac atgctactac ggtttaatca ttcttgagta 11160  
 cctatatatt ctaataaatc agtatgtttt taattatttt gatattactg gtacttaaca 11220  
 tgtttagata catcatatag catgcacatg ctgctactgt ttaatcattc gtgaataacct 11280  
 atatatctta atatatcagt atgtcttcta attattatga ttttgatgta cttgtatggg 11340  
 10 ggcatatgct gcagctatgt gtagattttg aatacccgat gtgatgagca tgcagggcgc 11400  
 ctctcatagtt catatgctgt ttatttccct tgagactggt cttttttgtt gatagtcacc 11460  
 ctggtgtttg gtgattctta tgcaccgggg gatcctctag agtcgacctg caggcgggcg 11520  
 cactagtgat taggattcca acgcgagcca ggacaagcga ggaaccttgc gtgcgaggcg 11580  
 aggcgcggcc gctccgattc gattcgacgc gcaggcgag gcgcagggat ggacgccttc 11640  
 tactcgacct cgtcggcggc ggcgagcggc tggggccacg actccctcaa gaacttccgc 11700  
 cagatctccc ccgcggtgca gtcccacctc aagctcgttt acctgactct atgctttgca 11760  
 15 ctggcctcat ctgccgtggg tgettacctc cacattgccc tgaacatcgg cgggatgctg 11820  
 acaatcgctc cttgtgtcgg aactatcgcc tggatgttct cggtgccagt ctatgaggag 11880  
 aggaagaggt ttgggctgct gatgggtgca gccctcctgg aaggggcttc ggttggaact 11940  
 ctgattgagc ttgccataga ctttgaccca agcatcctcg tgacagggtt tgcggaacc 12000  
 gccatcgctt ttgggtgctt ctctggcgcc gccatcatcg ccaagcgcag ggagtacctg 12060  
 20 tacctcggtg gctgctctc gtctgctgc togatcctgc tctggctgca gtttgtcacg 12120  
 tccatctttg gccactctc tggcagcttc atgtttgagg tttactttgg cctgttgatc 12180  
 ttctgggggt acatggtgta cgacacgcag gagatcatcg agagggcgca ccatggcgac 12240  
 atggactaca tcaagcacgc cctcaccctc ttcaccgact ttgttgccgt cctcgctcca 12300  
 gtccatcatca tctgctcaa gaacgcaggg gacaagtcgg aggacaagaa gaagacgaag 12360  
 25 aggggggtcct gaacgtwtct cccgcacatg tagataccgt caccgcgtcg acctgcaggc 12420  
 atgcccgtctg aaatcaccag tctctctcta caaatctatc tctctcataa taatgtgtga 12480  
 gtagttccca gataagggaa ttagggttct tatagggttt cgctcatgtg ttgagcatat 12540  
 aagaaaccct tagtatgtat ttgtatttgt aaaatactt tatcaataaa atttctaatt 12600  
 30 cctaaaacca aaatccagt ggtaccgagc tgc 12633

&lt;210&gt; 35

&lt;211&gt; 5598

&lt;212&gt; DNA

35 &lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Beschreibung der künstlichen Sequenz: recombinant expression vector pOXoBI-1

40

&lt;400&gt; 35

ggggatcctc tagagtcgac ctgcaggcgg ccgcactagt gattaggatt ccaacgcgag 60  
 ccaggacaag cgaggaacct tgcgtgcgag gcgaggcgcg cccgctccga ttcgattcga 120  
 45 cgcgaggcgg caggcgagg gatggacgcc ttctactcga cctcgtcggc ggcgcgagc 180  
 ggctggggcc acgactccct caagaacttc cgccagatct ccccgccgt gcagtccac 240  
 ctcaagctcg tttacctgac tctatgcttt gcactggcct catctgccgt ggggtgcttac 300  
 ctacacattg cctgaacat cgccgggatg ctgacaatgc togtttgtgt cggaactatc 360  
 gcttgatgt tctcggtgcc agtctatgag gagaggaaga ggtttgggct gctgatgggt 420  
 50 gcagccctcc tgggaagggg ttcggttgga cctctgattg agcttgccat agactttgac 480  
 ccaagcatcc tctgtacagg gtttgcgga accgccatcg cctttgggtg cttctctggc 540  
 gccgccatca tcgccaaagc caggagatc ctgtacctcg gtggcctgct ctgctctggc 600  
 ctgtcgatcc tgcctcggct gcagtttgct acgtccatct ttggccactc ctctggcagc 660  
 ttcatgtttg aggtttactt tggcctgttg atcttctctg ggtacatggt gtacgacacg 720  
 caggagatca tctgaggggc gcacctggc gacatggact acatcaagca cgccctcacc 780  
 55 ctcttcaccg actttgttgc cgtcctcgct cgagtccctc tcatcatgct caagaacgca 840  
 ggcgacaagt cggaggacaa gaagaagagg aagagggggg cctgaacgtw tctcccgac 900  
 atgtagatac cgtcaccgcg tcgacctgca ggcattgccc ctgaaatcac cagtctctct 960  
 ctacaaatct atctctctca taataatgtg tgagtatttc ccagataagg gaattagggt 1020  
 60 tcttataggg ttctgctcat gtgttgagca tataagaaaac ccttagtatg tatttgtatt 1080  
 tgtaaaatac ttctatcaat aaaatttcta attcctaaaa ccaaaatcca gtgggtaccg 1140  
 agctcgaatt caagcttggc actggcgcgt gttttacaac gtcgtgactg ggaaaaccct 1200  
 ggcgttacc aacttaatcg ccttgacgca catccccctt tcgccagctg gcgtaatagc 1260  
 65 gaagaggccc gcaccgatcg cccctcccaa cagtgtcgca gctgtgagc gcgtgaatgg 1320  
 ctgatgcggg attttctcct tacgcctctg tgcggtattt cacaccgcat atgggtgact 1380  
 ctcagtacaa tctgctctga tgccgcatag ttaagccagc cccgacaccc gccaacaccc 1440  
 gctgacgcgc cctgacgggc ttgtctgctc ccggcatccg cttacagaca agctgtgacc 1500  
 gtctccggga gctgcatgtg tcagaggttt tcaccgtcat caccgaaacg gcgagacgca 1560  
 aagggcctcg tgatacgctt atttttatag gttaatgtca tgataataat ggtttcttag 1620  
 70 acgtcagggt gactttttcg gggaaatgtg cgcggaaacc ctatttgttt atttttctaa 1680  
 atacattcaa atatgtatcc gctcatgaga caataaccct gataaatgct tcaataat 1740  
 tgaaaaagga agagtatgag tattcaacat ttccgtgtcg cctttattcc cttttttgcy 1800  
 gcattttgcc ttctgtttt tgctcaccga gaaacgctgg tgaaagtaaa agatgctgaa 1860  
 gatcagttgg gtgcacgagt gggttacatc gaactgggat tcaacagcgg taagatcctt 1920

	gagagttttc	gccccgaaga	acgtttttcca	atgatgagca	cttttaaagt	tctgctatgt	1980
	ggcgcggtat	tatcccgtat	tgacgcgggg	caagagcaac	tccgtcgccg	catacactat	2040
	tctcagaatg	acttggttga	gtactcacca	gtcacagaaa	agcatcttac	ggatggcatg	2100
5	acagtaagag	aattatgcag	tgctgccata	accatgagtg	ataacactgc	ggccaactta	2160
	cttctgacaa	cgatcggagg	accgaaggag	ctaaccgctt	ttttgcacaa	catgggggag	2220
	catgtaactc	gccttgatcg	ttgggaaccg	gagctgaatg	aagccatacc	aaacgcagag	2280
	cgtgacacca	cgatgcctgt	agcaatggca	acaacgttgc	gcaaactatt	aactggcgaa	2340
	ctacttactc	tagcttcccg	gcaacaatta	atagactgga	tggaggcgga	taaagttagc	2400
10	ggaccacttc	tgcgctcggc	ccttcgggct	ggctgggtta	ttgctgataa	atctggagcc	2460
	ggtgagcgtg	ggtctcgggg	tatcattgca	gcactggggc	cagatggtaa	gccctccgct	2520
	atcgtagtta	tctacacgac	ggggagtcag	gcaactatgg	atgaacgaaa	tagacagatc	2580
	gctgagatag	gtgcctcact	gattaagcat	tggtaaactgt	cagaccaagt	ttactcatat	2640
	atacttttaga	atacttttaa	acttcatttt	taacttaaaa	ggatctaggt	gaagatcctt	2700
15	tttgataatc	tcatgaccaa	aatcccttaa	cgtgagtttt	cggtccactg	agcgtcagag	2760
	cccgtagaaa	agatcaaagg	atcttcttga	gatccctttt	ttctgcgcgt	aatctgctgc	2820
	ttgcaaacaa	aaaaaccacc	gctaccagcg	gtgggtttgt	tgcgggatca	agagctacca	2880
	actctttttc	cgaaggtaac	tggttccagc	agctggcaga	taccaaatac	tgtcttctta	2940
	gtgtagcogt	agttaggcca	ccacttcaag	aaactctgtg	caccgcctac	atacctcgct	3000
20	ctgctaatac	tgttaccagt	ggctgctgcc	agtggcgata	agtcgtgtct	taccgggttg	3060
	gactcaagac	gatatgttacc	ggataaggcg	cagcggctcg	gctgaacggg	gggttcgtgc	3120
	acacagccca	ttctggagcg	aacgacctga	acogaactga	gatacctaca	gcgtgagctt	3180
	tgagaaagcg	ccacgccttc	cgaaggggaga	aaggcgggaca	ggatatccgt	aagcggcagg	3240
	gtcgggaacag	gagagcgcac	gagggagcct	ccaggggggaa	acgcctggta	tctttatagt	3300
25	cctgtcgggt	ttcgccacct	ctgacttgag	cgctcgatttt	tgtgatgctc	gtcagggggg	3360
	cggaagctat	ggaaaaacgc	cagcaacgcg	gccttttttac	ggttcctggc	ctttgtctgg	3420
	ccttttgcct	acatgtttct	tcttgcgtta	tcccttgatt	ctgtggataa	ccgtattacc	3480
	gcctttgagt	gagctgatac	cgctcgccgc	agccgaacga	ccgagcgcag	cgagtcagtg	3540
	agcgaggaag	cgggaagagcg	cccaatacgc	aaaccgcctc	tccccgcgcg	ttggccgatt	3600
30	cattaatgca	gctggcacga	caggtttccc	gactggaaag	cgggcagtg	gcgcacagca	3660
	attaatgtga	gttagctcac	tcattaggca	ccccaggcct	tacactttat	gcttccggct	3720
	cgtatgttgt	gtggaattgt	gagcggataa	caatttcaca	caggaaacag	ctatgaccat	3780
	gattacgaat	tcccatgcct	cgagcagaaa	gatataatat	gtaaaaaaat	gggtctatat	3840
	atatgggaag	tttcaggaag	acaaagggtc	tagaaacttc	caaaaaaaat	ccgaaatata	3900
35	ttttggaaga	aataccctct	tgggttggcc	ccggcgcagc	ccctagtggg	ccaaaaagcc	3960
	acgatctaata	cccgggtctaa	ttgggtctaata	agtttagact	tctaattaga	cggtctctta	4020
	tgcgggtcta	attggtctaa	ttagattaaa	atccctaatta	aatatgaacg	caactaggct	4080
	ccccctctct	ctgtttttct	cgagctctct	tttcatggac	cttgaagtat	tgccggatca	4140
	ctacttcgga	actcgtggat	acttcagagt	gcacatctac	tttgaatctt	gatttgtaga	4200
40	tcactctcgga	gaaattctca	cagttgggag	gtataaccag	ttgccgaaat	tgccatgctt	4260
	cactcacagc	caggatcacg	ccatgtccca	aggcaaccct	tgtagctaca	tgccgaggcc	4320
	tgactacttg	gggcctcgcg	ccctgcattt	ttgcatgttc	atgtgacacg	ttaaaatttg	4380
	agagaaatag	attactaaat	atcaccattt	tcgttattct	agatgagtat	cctacaatat	4440
	gtataccgaa	aaatgtattt	taactctgtg	taggttgagaa	agatctatta	aaaagaactc	4500
45	tacgtatact	ccccctccc	aatccccatc	caggtttgta	agacactttc	gtcttttttt	4560
	gccgaatttt	aaccgtaaat	ttgactagta	aaaataagtt	atactgaatg	taataaatat	4620
	cgtacattcg	gatgttggag	acaggggagag	gctggctggg	gcgctggatg	gatcacggtc	4680
	agaaagtctg	acttgcaacg	ccacaggccc	gttgattggc	actgacaacc	aagttttctg	4740
	tggttcgctg	gtgccatatt	ttccgcgac	gaatatttaa	actgcgagga	gaaaggcaag	4800
50	cagggcgcca	tatcagcact	tgatcactca	ctgatcgatc	agtagtagcc	accttctctg	4860
	cgccgacgtg	ttatatatta	ttggcaacaa	gtcatcgatt	gagaacagaa	acaaaacaag	4920
	aagagaacta	tttgagagag	agtagttacg	ccgcagcgag	tagcctccca	tttctgacga	4980
	tcatgccata	cgataaacgc	gcccggcgcg	agaccagtta	gcaaggttga	aatgccaaac	5040
	catgtcgcgc	tcattttctcg	gctttttcat	tttgcattgc	gtcatgcagg	ccctggacac	5100
55	tgacattttc	ctctttttgct	gttgaatgaa	gaccttaacc	tttcaccatc	agcacgcccc	5160
	tcaacttgat	aagcctagac	gaaaccatac	tgcatgattg	atgagtaatg	gtgtgcacga	5220
	atattatgaa	cccgtttcca	agagcaatac	tccattgaga	tacacctcct	ccttgatctt	5280
	gttcgttggt	cccatttcca	tagcagcccg	cagtggcctt	gactctgact	cccacgcaag	5340
	taatataatc	ttataaaact	cgctgccttg	cttcgtgtgt	ccatttgcaa	atgcatgcag	5400
	tgacgacatg	cacatgcata	gcttaattag	ctccatgcac	ccactgcttc	cattaatccc	5460
60	ctatataaag	gactccatat	gcctccatcc	tcactcatcc	accacagctt	agcagcagca	5520
	acaaccagtg	ccatagacac	tctccatcaa	caaactctag	ctgatcaatc	ctagctaagg	5580
	ttattacata	gcaagccc					5598
65	<210>	36					
	<211>	12776					
	<212>	DNA					
	<213>	Künstliche Sequenz					
70	<220>						
	<223>	Beschreibung der künstlichen Sequenz: recombinant expression vector pLol140XoBI-1					



<400> 36  
 aattcactg cccgtcggtttt acaacgactc agagcttgac aggaggcccg atctagtaac 60  
 atagatgaca cccgcgcgcga taattttatcc tagtttgccg gctatatattt gttttctatc 120  
 5 gcgtattaaa tgtataattg cgggactcta atcataaaaa cccatctcat aaataacgtc 180  
 atgcattaca tgttaattat tacatgttta acgtaattca acagaaatta tatgataatc 240  
 atcgcaagac cggcaacagg attcaatctt aagaaacttt attgccaaat gtttgaacga 300  
 tcggggatca tccgggtctg tggcgggaac tccacgaaaa tatccgaacg cagcaagatc 360  
 tagagcttgg gtcccgcctca gaagaactcg tcaagaaggc gatagaaggc gatcgctgc 420  
 10 gaatcgggag cggcgatacc gtaaagcagc aggaagcggc cagcccatte gccgccagc 480  
 tcttcagcaa tatcacgggt agccaacgct atgtcctgat agcgggtccg cacaccagc 540  
 cggccacagt cgtatgaatcc agaaaagcgg ccattttcca ccatgatatt cggcaagcag 600  
 gcatcgccat gggtcacgac gagatcctcg cctcggggca tgccgcctt gagcctggcg 660  
 aacagttcgg ctggcgcgag cccctgatgc tcttcgtcca gatcatcctg atcgacaaga 720  
 cgggttcca tccgagtacg tgctcgctcg atgcgatgtt tcgcttggtg gtcgaatggg 780  
 15 caggtagccg gatcaagcgt atgcagccgc cgcattgcat cagccatgat ggatactttc 840  
 tcggcaggag caaggtgaga tgacaggaga tccctgcccg gcacttcgcc caatgacagc 900  
 cagctccctc cgccttcagt tgacaggaga agcacagctg cgcaaggaaac gcccgctcgtg 960  
 gccagccacg atagccgcgc tgctcgtcc tgacgttcat tcaggggcacc ggacaggctc 1020  
 gtcttgacaa aaagaacccg ggcggcctgc gctgacagcc ggaacacggc ggcatcagag 1080  
 20 cagccgattg tctgttgtgc ccagtcatag ccgaatagcc tctccacca agcggccgga 1140  
 gaacctgctg gcaatccatc ttgttcaatc atgcgaaacg atccagatcc ggtgcagatt 1200  
 atttggattg agagtgaata tgagactcta attggatacc gaggggaatt tatggaaactg 1260  
 cagtggagca tttttgacaa gaaatatattg cttagctgata gtgaccttag gcgacttttg 1320  
 25 acagcgcaat aatggtttct gagctatgtg ttagctcat taaactccag aaacctggcg 1380  
 ctgattggct ccttcaacgt tgccggttctg tcagttccaa acgtaaaacg gcttgtcccg 1440  
 cgtcatcggc gggggtcata acgtgactcc cttaattctc cgtcatgat cagattgtcg 1500  
 tttcccgctc tcagtttaaa ctatcagttg ttgacaggat cctgcttggg aataattgtc 1560  
 attagattgt ttttatgcat agatgcactc gaaatcagcc aatttttagac aagtatcaaa 1620  
 30 cggatgttaa ttcagtacat taaagacgtc cgcaatgtgt tattaagttg tctaagcgtc 1680  
 aatttgttta caccacaata tatcctgcc aacagctccc cgaccggcag 1740  
 ctccgcacaa aatcaccacg cgttaccacc acgcccggcg gccgcatggg gttgaccgtg 1800  
 ttccgcggca ttgcccagtt cgagcgttcc ggcccccgcc ctacctcac cccggcacag 1920  
 35 gaggccgcca agggccgagg cgtgaagttt gaagggccga ccgtgaaaga ggcggctgca 1980  
 atcgcgacag cccgcgagct gatcgaccag cgcgcacttg agcgcagcga ggaagtgcg 2040  
 ctgcttggcg tgcatcgctc gacctgttac cgtgaggagc cattgaccga gggcgacgcc 2100  
 cccaccgagg ccaggcggcg acgccaagag gaacaagcat gaaaccgcac caggacggcc 2160  
 ctggcggccg ccgagaatga accgaagaga tcgaggcgga gatgatcgcg gccgggtacg 2220  
 40 aggacgaacc gtttttcatt accgaagaga tgccgctgca tgaatcctg gccggtttgt 2280  
 tgctcagacc gcccgcgcac gtctcaaccg gtttggccg ccatgcccgc gctgctgata 2340  
 ctgatgcaa gctggcgcc tttgagtaaa acagcttgcg atgaaggtta tcgctgtact 2400  
 gtctaaaaag tgatgcatg agtaataaaa caaatacgca aggggaacgc catctagccc 2460  
 taaccgaaaa ggcgggtcag gcaagacgac catcgcaacc cagggcagtg cccgcgattg 2520  
 45 actccgcccg gccgatgttc tgttgcttcc cgttgcggc atcgaccgcc cgacgattga 2580  
 ggcggccgtg cgggaagatc aaccgctaac cgttgcggc atcgaccgcc cgccccaggc 2640  
 ccgcgacgtg aaggccatcg gccggcgcca cctcgtatg atcgaccgcc cgccccaggc 2700  
 ggcggacttg gctgtgtccc cgatcaaggc acccgacttc cgtgtgattc cgggtgaccc 2760  
 50 aagcccttac gacatatggg ccaccgcca gctgggtgag ctggttaagc agcgcattga 2820  
 ggtcacggat ggaaggctac aagcggcctt tgcgtgtcg cggcgatca aaggcacgcg 2880  
 catcgccggt gaggttgccc aggcgctggc cgggtacgag ctgcccattc ttgagtccc 2940  
 55 tatcacgcag cgcgtgagct acccaggcac tgccgcggcc ggcaacaacc tctttgaatc 3000  
 agaaccggag ggcgacgctg cccgcgaggt ccaggcgtg gccgctgaaa ttaaatcaaa 3060  
 actcatttga gttaatgagg taaagagaaa atgagcaaaa gcacaaacac gctaagtgc 3120  
 ggcgctccga gcgcacgcag cagcaaggct gcaacgttgg ccagcctggc agacacgcca 3180  
 60 gccatgaagc ggttcaactt tcagttgccc gcggaggatc acaccaagct gaagtgtac 3240  
 gcggtacgcc aaggcaagac cattaccgag ctgctatctg aatacatcgc gcagctacca 3300  
 gagtaaatga gcaaatgaat aaatgaatag atgaatttta gcggctaaag gaggcggcat 3360  
 ggaaaatcaa gaacaaccag gcaccgacgc cgtggaatgc cccatgtgtg gaggaacggg 3420  
 65 cggttggcca ggcgtaagcg gctgggttgt ctgcccggcc gcccgggtaca aatcgccgcg 3480  
 caagcccagc gaatcggcgt gagcgggtcg aaaccatccg gcccgggtaca aatcgccgcg 3540  
 gcgctgggtg atgacctggt ggagaagttg aaggccgcgc aggcgccccca gcggcaacgc 3600  
 atcgaggcag aagcaccgccc cgttgaatcg tggcaagcgg ccgctgatcg aatccgcaaa 3660  
 gaatcccggc aaccgcggc agccggtgag cgtcgatta ggaagccgcc caagggcgac 3720  
 gagcaaccag attttttcgt tccgatgctc tatgacgtgg gcacccgcga tagtcgcagc 3780  
 70 atcatggacg tggccgtttt cctctgtcgc aagcgtgacc gacgagctgg cgaggtgatc 3840  
 cgctacgagc ttccagacgg gcacgtagag gtttccgcag ggcggcccg catggccagt 3900  
 gtgtgggatt acgacctggt actgatggcg gtttccatc taaccgaatc catgaaccga 3960  
 taccgggaag ggaagggaga caagcccggc cgcgtgttcc gtccacacgt tgcggacgta 4020  
 ctcaagttct gccggcgagc cgtggcgga aagcagaaa agacactgct agaaacttgc 4080  
 attcgggtta atccacgcga cgttgccatg cagcgtacga agaaggccaa gaacggccg 4140  
 ctggtgacgg tatccgagg tgaagccttg attagccgct acaagatcgt aaagagcgaa 4200  
 accggcgccg cggagtacat cgagatcgag ctagctgatt ggatgtaccg cgagatcaca 4260  
 gaaggcaaga acccgacgt gctgacggtt caccgccgatt actttttgat cgatcccggc 4320

	atcgccgctt	ttctctaccg	cctggcacgc	cgcgccgcag	gcaaggcaga	agccagatgg	4380
	ttgttcaaga	cgatctacga	acgcagtggc	agcgccggag	agttcaagaa	gttctgtttc	4440
	accgtgcgca	agctgatcgg	gtcaaatgac	ctgcccggagt	acgatttgaa	ggaggaggcg	4500
5	ggcgaggctg	gcccgatcct	agtcattgcg	taccgcaacc	tgatcgaggg	cgaagcatcc	4560
	gccggttctt	aatgtacgga	gcagatgcta	gggcaaatgt	ccctagcagg	ggaaaaaggt	4620
	cgaaaagggtc	tctttcctgt	ggatagcacg	tacattggga	acccaaagcc	gtacattggg	4680
	aaccggaacc	cgtacattgg	gaacccaaag	ccgtacattg	ggaaccgggtc	acacatgtaa	4740
	gtgactgata	taaaagagaa	aaaaggcgat	ttttccgcct	aaaactcttt	aaaacttatt	4800
10	aaaactctta	aaacccgcct	ggcctgtgca	taactgtctg	gccagcgcac	agccgaagag	4860
	ctgcaaaaag	cgcctaccct	tcggtcgctg	cgctccctac	gccccgcgcg	ttcgcgctcg	4920
	cctatcgcg	ccgctggccg	ctcaaaaatg	gctggcctac	ggccaggcaa	tctaccaggg	4980
	cgcgagcaag	ccgcgccgct	gccactcgac	cgccggcgcc	cacatcaagg	caccctgcct	5040
	cgcgcgtttc	ggtgatgacg	gtgaaaacct	ctgacacatg	cagctcccgg	agacgggtcag	5100
15	agcttgtctg	taagcggatg	ccgggagcag	acaagcccgt	cagggcgcg	cagcggtgtg	5160
	tggcggtgtg	cggggcgcg	ccatgaccca	gtcacgtagc	gatagcggag	tgtatactgg	5220
	cttaactatg	cggcatcaga	gcagattgta	ctgagagtgc	accatatgcg	gtgtgaaata	5280
	ccgcacagat	cgctaaggag	aaaataccgc	atcagcgct	cttcgcgctc	ctcgctcact	5340
	gactcgctgc	gctcggtcgt	tcggctgctg	cgagcgggtat	cagctcactc	aaaggcggtg	5400
20	atacggttat	ccacagaatc	aggggataac	gcaggaaaga	acatgtgagc	aaaaggccag	5460
	caaaaggcca	ggaaccgtaa	aaaggccg	ttgctggcgt	ttttccatag	gtcccgcccc	5520
	cctgacgagc	atcacaaaaa	tcgacgctca	gttcagaggt	ggcgaaaccc	gacaggcata	5580
	taaagatacc	aggcggttcc	ccctggaagc	tcctctgctg	gctctcctgt	tcggacctg	5640
	ccgcttaccg	gatacctgtc	cgctttcttc	ccttcgggaa	gcgtggcgct	ttctcatagc	5700
25	tcacgctgta	ggtatctcag	ttcggtgtag	gtcgttcgct	ccaagctggg	ctgtgtgcac	5760
	gaaccccccg	ttcagcccg	ccgctgcg	ttatccggtg	actatcgctc	tgagttcaac	5820
	ccggtaagac	acgacttatc	gccactggca	gcagccactg	gtaacaggat	tagcagagcg	5880
	aggtatgtag	gcggtgtctac	agagttcttg	aagtgggtggc	ctaactacgg	ctacactaga	5940
	aggacagtat	ttggtatctg	cgctctgctg	aagccagtta	ccttcggaaa	aagagttggt	6000
30	agctcttgat	ccggcaaaaca	aaccaccg	ggtagcgggtg	gtttttttgt	ttgcaagcag	6060
	cagattacgc	gcagaaaaaa	aggatctcaa	gaagatcctt	tgatcttttc	tacggggtct	6120
	gacgctcagt	ggaacgaaaa	ctcacgttaa	gggatttttg	tcattgcatga	tatatctccc	6180
	aatttggtga	gggcttatta	tgcacgctta	aaaataataa	aagcagactt	gacctgatag	6240
35	tttggtgtg	agcaattatg	tgcttagtgc	atctaagcgt	tgagtttaag	cgccgcgcga	6300
	agcggcgctg	gcttgaacga	atttctagct	agacattatt	tgccgactac	ccttggtgatc	6360
	tcgcctttca	cgtagtggac	aaattcttcc	aactgatctg	cgcgcgaggc	caagcgatct	6420
	tcttctgttc	caagataagc	ctgtctagct	tcaagtatga	cgggctgata	ctgggcccgc	6480
	aggcgctcca	ttgccaagtc	ggcagcgaca	tccttcggcg	cgatttttgc	ggttactgcg	6540
40	ctgtaccaaa	tgccgggacaa	cgtaagcact	acatttcgct	catcgccagc	ccagtcgggc	6600
	ggcgagttcc	atagcgttaa	ggttttcattt	agcgccctcaa	atagatcctg	ttcaggaacc	6660
	ggatcaaaga	gttcctccgc	cgctggacac	accaaggcaa	cgctatgttc	tcttgctttt	6720
	gtcagcaaga	tagccagatc	aatgtcgatc	gtggctggct	cgaagatacc	gtgcaagattg	6780
	tcattgcgct	gccattctcc	aaattgcagt	tcgcgcttag	ctggataacg	ccacggaatg	6840
	atgtcgtcgt	gcacaacaat	ggtgactttc	acagcgcgga	gaatctcgct	ctctccaggg	6900
45	gaagccgaag	tttccaaaag	gtcgtgtgac	aaagctcgcc	gcgttggttc	atcaagcctt	6960
	acgggtcaccg	taaccagcaa	atcaatatca	ctgtgtggct	tcaggccgcc	atccactgcg	7020
	gagccgtaca	aatgtacggc	cagcaacgct	ggttcgagat	ggcgctcgat	gacgccaact	7080
	acctctgata	ggtgagtcga	tacttcggcg	atcacgcctt	cccccatgat	gttttaacttt	7140
50	gttttagggc	gactgccctg	ctgcgtaaca	tcgttgctgc	tcataacat	caaactatga	7200
	cccacggcgt	aacgcgcttg	ctgcttggat	gcccaggcca	tagactgtac	ccccaaaaaa	7260
	cagtcataac	aagccatgaa	aaccgccact	gcgggggttc	catggacata	caaattggacg	7320
	aacggataaa	ccttttcacg	cccttttaaa	tatccgatta	ttctaataaa	cgctcttttc	7380
	tcttaggttt	acccgccaat	atatcctgtc	aaacactgat	agtttaaatg	gaaggcgagg	7440
55	aacgacaatc	agatctagta	ggaaacagct	atgaccatga	ttacgccaag	ttgcatgccc	7500
	tgacggctga	ctctagagga	tcgatccccg	ggtaggtcag	tccttatgtg	tacgtcctgt	7560
	agaaacccca	acccgtgaaa	tcaaaaaact	cgacggcctg	tgggcattca	gtctggatcg	7620
	cgaaaactgt	ggaattgggtc	agcgttggtg	ggaaagcgcg	ttacaagaaa	gccgggcaat	7680
	tgctgtgcca	ggcagtttta	acgatcagtt	cgccgatgca	gatattcgta	attatgcggg	7740
	caacgtctgg	tatcagcgcg	aagtctttat	accgaaaagg	tgggcaggcc	agcgtatcgt	7800
60	gctgcgtttc	gatcggttca	ctcattacgg	caaagtgtgg	gtcaataatc	aggaagtgtg	7860
	ggagcatcag	ggcggtctata	cgccatttga	acgcggtatg	acgcggtatg	ttatgtccgg	7920
	gaaaagtgtg	cgtaagtttc	tgcttctacc	tttgatatat	atataataat	tatcattaat	7980
	tagtagtaat	ataatatttc	aaatattttt	ttcaaaaata	aagaatgtag	tatatagcaa	8040
	ttgcttttct	gtagtttata	agtggtgata	ttttaattta	taacttttct	aatatatgac	8100
65	caaaatttgt	tgatgtgcag	gtatcacccg	ttgtgtgaac	aacgaactga	actggcagac	8160
	tatcccgccg	ggaatggtga	ttaccgacga	aaacggcaag	aaaaagcagt	cttacttcca	8220
	tgatttcttt	aactatgccg	gaatccatcg	cagcgtaatg	ctctacacca	cgccgaacac	8280
	ctgggtggac	gatatcaccg	tggtgacgca	tgctcgccaa	gactgtaacc	acgctctgtg	8340
	tgactggcag	gtggtggcca	atggtgatgt	cagcgttgaa	ctgcgtgatg	cggatcaaca	8400
70	ggtggttgca	actggacaag	gcactagcgg	gactttgcaa	gtggtgaatc	cgcacctctg	8460
	gcaaccgggt	gaaggttatc	tctatgaact	gtgcgtcaca	gccaaaagcc	agacagagtg	8520
	tgatatctac	ccgcttcg	ctggcaccg	gtcagtgcca	gtgaagggcg	aacagttcct	8580
	gattaaccac	aaaccgttct	actttactgg	ctttggtcgt	catgaagatg	cggacttgcg	8640
	tggcaaaagg	ttcgataacg	tgctgatggt	gcacgaccac	gcattaatgg	actggattgg	8700

	ggccaactcc	taccgtacct	cgcattaccc	ttacgctgaa	gagatgctcg	actggggcaga	8760
	tgaacatggc	atcgtgggtga	ttgatgaaac	tgctgctgtc	ggctttaacc	tctcttttagg	8820
	cattgggttc	gaagcgggca	acaagccgaa	agaactgtac	agcgaagagg	cagtcacacgg	8880
5	ggaaactcag	caagcgcact	tacaggcgat	taaagagctg	atagcgcgtg	acaaaaacca	8940
	cccaagcgtg	gtgatgtgga	gtattgccaa	cgaaccggat	acccgtccgc	aaggtgcacg	9000
	ggaatatattc	gcgccactgg	cggaagcaac	gcgtaaactc	gacccgacgc	gtccgatcac	9060
	ctgcgtcaat	gtaatgttct	gcgacgctca	caccgatacc	atcagcgatc	tctttgatgt	9120
	gctgtgcctg	aaccgttatt	acggatggta	tgtccaaagc	ggcgatttgg	aaacggcaga	9180
10	gaaggctactg	gaaaaagaac	ttctggcctg	gcaggagaaa	ctgcatcagc	cgattatcat	9240
	caccgaatac	ggcgtggata	cgtagccgg	gctgcactca	atgtacaccg	acatgtggag	9300
	tgaagctgat	cagtggtcat	ggctggatat	gctacaccgc	gtctttgatc	gcgtcagcgc	9360
	cgctgcgggt	gaacagggtat	ggaatttcgc	gatttttgcg	acctcgcaag	gcataattgcg	9420
	cgttggcgggt	aacaagaaag	ggatcttcac	tgcgcaccgc	aaaccgaagt	cgccggccttt	9480
15	tctgtctgcaa	aaacgctgga	ctggcatgaa	cttcggtgaa	aaaccgcagc	agggaggcaa	9540
	acaatgagag	ctcgaatttc	cgcgatcggt	caaacatttg	gcaataaagn	tctttaaagt	9600
	tgaatcctgt	tgccgggtctt	gcatgatgta	tcatataatt	tctgttgaat	tacgttaagc	9660
	atgtaataat	taacatgtaa	tgcatgacgt	tatttatgag	atgggttttt	atgattagag	9720
	tcccgcatt	atacatttaa	tacgcgatag	aaaacaaaat	atanccgcga	aactaggata	9780
20	aattatcgcg	cgcgggtgtca	tctatgttat	tagatcggga	attcccatgc	ctcgacgaga	9840
	aagatataat	atgtaaaaaa	atgggtctat	atataatgaa	gggtttcagga	agacaaaggt	9900
	tctagaaact	tccaaaaaaa	atccagaata	tatttttgaa	gaaataccct	cttgggttgg	9960
	ccccggcgca	gcccctagt	ggccaaaaag	ccacgactca	atcccgtct	aattgggtcta	10020
	atagttttaga	cttctaatt	gacgggctct	tatgcggctc	taattgggtc	aattagatta	10080
25	aaatccta	taaatatgaa	cgcaactagg	cttcccctct	ctctagtttt	ctcgggctc	10140
	tttttcatgg	accttgaagt	attgcccggat	cactactctc	gaactcgtgg	atacttcaga	10200
	gtgcacatct	actttgaatc	ttgattggta	gatcatctcg	gagaaaattct	cacagttggg	10260
	aggtataacc	agttgcccga	attgccatgc	ttactacaca	gccaggatca	gcccctgtcc	10320
	caaggcaacc	ctttagtcta	catgcccagg	cctgactact	tgggggcctcg	cgccctgcac	10380
30	ttttgcatgt	tcatgtgaca	cgttaaatgt	tgagagaaat	agattactaa	atatcaccca	10440
	tttcggttatt	ctagatgagt	atcctacaat	atgtataccg	aaaaatgtat	tttaaaactgt	10500
	ggtaggtgag	aaagatctat	taaaaagaac	tctactgata	ctccccctc	ccaattccca	10560
	tccaggtttg	taagacactt	tctctttttt	ttgcccgaatt	ttaaccgtaa	atttgactag	10620
	taaaaataag	ttatactgaa	tgtaataaat	atcgtacatt	cggatgttgg	agacagggag	10680
35	aggctgggtg	gtgcgctgga	tggatcacgg	tcagaaagtc	tgacttgcaa	cgccacaggc	10740
	ccgttgattg	ccactgacaa	ccaagttttc	gttgtttcgc	tggtgccata	ttttcccgca	10800
	tcgaatatatt	aaactgcgag	gagaaaggca	agcagggcgc	catatcagca	cttgcactact	10860
	cactgatcga	tcagtagtag	ccaccttctc	tgccgcgacg	tggttatatat	tattggcaac	10920
	aagtcacatga	ttgagaacag	aaacaaaaca	agaagagaac	tatttgagag	agagtagtta	10980
40	cgccgcagcg	agtagcctcc	catttctgac	gatcatgcca	tacgataaac	cgccggcggg	11040
	cgagaccagt	tagcaagggtt	gaaatgccc	cacatgtcgc	gctcatttct	cggtcttttc	11100
	attttgcattg	tctgcatgca	ggccctggac	actgacattt	ctctcttttg	ctgttgaaatg	11160
	aagaccctaa	cctttcacca	tcagcacgcc	cctcaacttg	ataagcctag	acgaaacca	11220
	tatgcatgat	tgatagtaaa	tggtgtgcac	gaattattatg	aaccggtttc	caagagcaat	11280
45	actccattga	gatacacctc	ctccttgat	ctgttcgttg	gtcccatttc	catagcagcc	11340
	ggcagtgagg	ttgactctga	ctgccacgca	agtaatatat	ctttaataaaa	ctcgtgcct	11400
	tgcttcgtgt	gtccatttgc	aaatgcatgc	agtgacgaca	tgacatgca	tagcttaatt	11460
	agctccatgc	atccactgct	tccatttaac	ccctataata	aggactccat	atgcctcacc	11520
	attcactcat	ccaccacagc	ttagcagcag	caacaaccag	tgccatagac	actctccatc	11580
50	aacaaactct	agctgatcaa	tcctagctaa	gcttattaca	tagcaagccc	ggggatccct	11640
	tagagtcgac	ctgcaggcgg	ccgcactagt	gattaggatt	ccaacgcgag	ccaggacaag	11700
	cgaggaaact	tgctgctgag	gcgaggccgc	cccgctccga	ttcgattcga	cgccgaggcg	11760
	caggcgcagg	gatggacgcc	ttctactcga	cctcgtcgcc	ggcggcgagc	ggctggggcc	11820
	acgactccct	caagaacttc	cgccagatct	ccccgcctg	gcagtcacc	ctcaagctcg	11880
55	tttaacctgac	tctatgcttt	gcactggcct	catctgccc	gggtgcttac	ctacacattg	11940
	ccctgaacat	cgccgggatg	ctgacaatgc	tcgcttgggt	cggaactatc	gcctggatgt	12000
	tctcgggtgcc	agtctatgag	gagaggaaga	ggtttgggct	gctgatgggt	gcagccctcc	12060
	tggaaggggc	ttcgggttga	cctctgattg	agcttgccat	agactttgac	ccaagcatcc	12120
	tcgtgacagg	gtttgtcgga	accgccatcg	cctttgggtg	cttctctggc	gccgccatca	12180
60	tcgccaagcg	cagggagtag	ctgtacctgc	gtggcctgct	ctcgtctggc	ctgtcgatcc	12240
	tgctctggct	gcagtttgtc	acgtccatct	ttggccactc	ctctggcagc	ttcatgtttg	12300
	aggtttactt	tggcctgttg	atcttcctgg	ggtacatggt	gtacgacacg	caggagatca	12360
	tcgagagggc	gcaccatggc	gacatggact	acatcaagca	cgccctcacc	ctcttcaccg	12420
	actttgttgc	cgtcctcgtc	tcactatgct	tcactatgct	caagaacgca	ggcgacaagt	12480
65	cgaggagcaa	gaagaagagg	aagagggggg	cctgaacgtw	tctccgcac	atgtagatac	12540
	cgtcaccgcg	tcgacctgca	ggcatgccc	ctgaaatcac	cagtcctctc	ctacaatct	12600
	atctctctca	taataatgtg	tgagtagtgc	ccagataaag	gaattagggt	tcttataggg	12660
	tttcgctcat	gtgttgagca	tataagaac	ccttagtatg	tatttgtatt	tgtaaaatc	12720
70	ttctatcaat	aaaattttcta	attcctaaaa	ccaaaatcca	gtgggtaccg	agctcg	12776

<210> 37  
 <211> 744  
 <212> DNA

<213> Triticum aestivum  
 <220>  
 <221> CDS  
 5 <222> (1)..(741)  
 <223> coding for TaBI-1  
 <400> 37  
 10 atg gac gcc ttc tac tcg acc tcg tcg gcg gcg gcg agc ggc tgg ggc 48  
 Met Asp Ala Phe Tyr Ser Thr Ser Ser Ala Ala Ala Ser Gly Trp Gly  
 1 5 10 15  
 15 tac gac tcc ctc aag aac ttc cgc gag atc tcc ccc gcc gtg cag tcc 96  
 Tyr Asp Ser Leu Lys Asn Phe Arg Glu Ile Ser Pro Ala Val Gln Ser  
 20 25 30  
 20 cac ctc aag ctc gtt tac ctg acc cta tgc ttt gcc ctg gcc tca tct 144  
 His Leu Lys Leu Val Tyr Leu Thr Leu Cys Phe Ala Leu Ala Ser Ser  
 35 40 45  
 25 gcc gtg ggt gct tac ctg cac att gcc ctg aac atc ggt ggg atg ctg 192  
 Ala Val Gly Ala Tyr Leu His Ile Ala Leu Asn Ile Gly Gly Met Leu  
 50 55 60  
 30 aca atg ctc gcg tgt gtt gga acc atc gcc tgg atg ttc tct gtg cca 240  
 Thr Met Leu Ala Cys Val Gly Thr Ile Ala Trp Met Phe Ser Val Pro  
 65 70 75 80  
 30 gtc tat gag gag agg aag agg ttt ggg ctg ctg atg ggt gca gcc ctc 288  
 Val Tyr Glu Glu Arg Lys Arg Phe Gly Leu Leu Met Gly Ala Ala Leu  
 85 90 95  
 35 ctg gaa ggg gct tcg gtt gga cct ctg att gag ctt gcc ata gac ttt 336  
 Leu Glu Gly Ala Ser Val Gly Pro Leu Ile Glu Leu Ala Ile Asp Phe  
 100 105 110  
 40 gac cca agt atc ctc gtg aca ggg ttt gtc gga acc gcc atc gcc ttc 384  
 Asp Pro Ser Ile Leu Val Thr Gly Phe Val Gly Thr Ala Ile Ala Phe  
 115 120 125  
 45 ggg tgc ttc tct ggc gcc gcc atc atc gcc aag cgc agg gag tac ctg 432  
 Gly Cys Phe Ser Gly Ala Ala Ile Ile Ala Lys Arg Arg Glu Tyr Leu  
 130 135 140  
 50 tac ctc ggt ggt ctg ctc tcc tcc ggc ctg tcg atc ctg ctc tgg ctg 480  
 Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser Gly Leu Ser Ile Leu Leu Trp Leu  
 145 150 155 160  
 50 cag ttt gcc acg tcc atc ttt ggc cac tcc tct ggc agc ttc atg ttt 528  
 Gln Phe Ala Thr Ser Ile Phe Gly His Ser Ser Gly Ser Phe Met Phe  
 165 170 175  
 55 gag gtt tac ttt ggc ctg ttg atc ttc ctg gga tac atg gtg tac gac 576  
 Glu Val Tyr Phe Gly Leu Leu Ile Phe Leu Gly Tyr Met Val Tyr Asp  
 180 185 190  
 60 acg cag gag atc atc gag agg gcg cac cac ggc gac atg gat tac atc 624  
 Thr Gln Glu Ile Ile Glu Arg Ala His His Gly Asp Met Asp Tyr Ile  
 195 200 205  
 65 aag cac gcg ctc acc ctc ttc acc gac ttc gtc gcc gtt ctc gtc cgc 672  
 Lys His Ala Leu Thr Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala Val Leu Val Arg  
 210 215 220  
 70 gtc ctc atc atc atg ctc aag aac gca ggc gac aag tcg gag gac aag 720  
 Val Leu Ile Ile Met Leu Lys Asn Ala Gly Asp Lys Ser Glu Asp Lys  
 225 230 235 240  
 aag aag agg aag agg ggg tcc tga 744  
 Lys Lys Arg Lys Arg Gly Ser  
 245

<210> 38  
 <211> 247  
 <212> PRT  
 <213> Triticum aestivum

5

<400> 38  
 Met Asp Ala Phe Tyr Ser Thr Ser Ser Ala Ala Ala Ser Gly Trp Gly  
 1 5 10 15

10 Tyr Asp Ser Leu Lys Asn Phe Arg Glu Ile Ser Pro Ala Val Gln Ser  
 20 25 30

His Leu Lys Leu Val Tyr Leu Thr Leu Cys Phe Ala Leu Ala Ser Ser  
 35 40 45

15

Ala Val Gly Ala Tyr Leu His Ile Ala Leu Asn Ile Gly Gly Met Leu  
 50 55 60

20 Thr Met Leu Ala Cys Val Gly Thr Ile Ala Trp Met Phe Ser Val Pro  
 65 70 75 80

Val Tyr Glu Glu Arg Lys Arg Phe Gly Leu Leu Met Gly Ala Ala Leu  
 85 90 95

25 Leu Glu Gly Ala Ser Val Gly Pro Leu Ile Glu Leu Ala Ile Asp Phe  
 100 105 110

Asp Pro Ser Ile Leu Val Thr Gly Phe Val Gly Thr Ala Ile Ala Phe  
 115 120 125

30

Gly Cys Phe Ser Gly Ala Ala Ile Ile Ala Lys Arg Arg Glu Tyr Leu  
 130 135 140

35 Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser Gly Leu Ser Ile Leu Leu Trp Leu  
 145 150 155 160

Gln Phe Ala Thr Ser Ile Phe Gly His Ser Ser Gly Ser Phe Met Phe  
 165 170 175

40 Glu Val Tyr Phe Gly Leu Leu Ile Phe Leu Gly Tyr Met Val Tyr Asp  
 180 185 190

Thr Gln Glu Ile Ile Glu Arg Ala His His Gly Asp Met Asp Tyr Ile  
 195 200 205

45

Lys His Ala Leu Thr Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala Val Leu Val Arg  
 210 215 220

50 Val Leu Ile Ile Met Leu Lys Asn Ala Gly Asp Lys Ser Glu Asp Lys  
 225 230 235 240

Lys Lys Arg Lys Arg Gly Ser  
 245

55

<210> 39  
 <211> 1293  
 <212> DNA  
 <213> Hordeum vulgare

60

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (173)..(1126)  
 <223> coding for Hordeum vulgare subsp. vulgare syntaxin  
 (Ror2)

65

<400> 39  
 gtaactaacc ccttcttccct cccttggtcca ctccgcttct ccccatccaa gaaacagcgc 60  
 caacagctcc acccatcgag gagaatcaag aaaccgcgcc ggcgtggtga tcaaggacat 120  
 ccatcgatcg atcgaccgac cctgccttgc ctgagtcaac ccggcggcag cc atg aac 178

70

Met Asn  
1

5	aac ctc ttc tcg agc tcg tgg aag cgg gcg ggc gcg ggg ggc gac ggg	226
	Asn Leu Phe Ser Ser Ser Trp Lys Arg Ala Gly Ala Gly Asp Gly	
	5 10 15	
10	gac ctg gag tcg ggc ggc ggc ggc gtg gag atg acg gcg ccg ccg ggc	274
	Asp Leu Glu Ser Gly Gly Gly Gly Val Glu Met Thr Ala Pro Pro Gly	
	20 25 30	
15	gcc gcg gcg ggg gcg agc ctg gac cgc ttc ttc gag gac gtg gag tcg	322
	Ala Ala Ala Gly Ala Ser Leu Asp Arg Phe Phe Glu Asp Val Glu Ser	
	35 40 45 50	
20	atc aag gac gac ctg cgg gag ctg gag cgg atc cag cgc tcc ctc cac	370
	Ile Lys Asp Asp Leu Arg Glu Leu Glu Arg Ile Gln Arg Ser Leu His	
	55 60 65	
25	gac ggc aac gag tcg ggc aag tcg ctc cac gac gcg tcg gcg gtg cgc	418
	Asp Gly Asn Glu Ser Gly Lys Ser Leu His Asp Ala Ser Ala Val Arg	
	70 75 80	
30	gcg ctc cgc tcc cgc atg gac gcc gac gtg gcc gcc gcc atc aag aag	466
	Ala Leu Arg Ser Arg Met Asp Ala Asp Val Ala Ala Ala Ile Lys Lys	
	85 90 95	
35	gcc aag gtg gtg aag ttg cgg ctc gag tcg ctc gac cgc gcc aac gcc	514
	Ala Lys Val Val Lys Leu Arg Leu Glu Ser Leu Asp Arg Ala Asn Ala	
	100 105 110	
40	gcc aac cgg tcc gtg gcc ggg tgc ggg ccg ggg tcg tcc acg gac cgc	562
	Ala Asn Arg Ser Val Ala Gly Cys Gly Pro Gly Ser Ser Thr Asp Arg	
	115 120 125 130	
45	acc cgc acc tcc gtc gtg gcc ggg ctg cgc aag aag ctg cgg gat gcc	610
	Thr Arg Thr Ser Val Val Ala Gly Leu Arg Lys Lys Leu Arg Asp Ala	
	135 140 145	
50	atg gag tcc ttc tcc tcc ctc cgc tcc cgc atc acc tcc gag tac cgg	658
	Met Glu Ser Phe Ser Ser Leu Arg Ser Arg Ile Thr Ser Glu Tyr Arg	
	150 155 160	
55	gaa acc gtg gcc cgc cgc tac ttc acg gtg acg ggg tcc cag ccc gac	706
	Glu Thr Val Ala Arg Arg Tyr Phe Thr Val Thr Gly Ser Gln Pro Asp	
	165 170 175	
60	gag gcc acg ctg gac acg ctg gcg gag acg ggg gag ggg gag cgg ctc	754
	Glu Ala Thr Leu Asp Thr Leu Ala Glu Thr Gly Glu Gly Glu Arg Leu	
	180 185 190	
65	ctg cag cgc gcc atc gcg gag cag cag ggg aga ggg gag gtg ctg ggc	802
	Leu Gln Arg Ala Ile Ala Glu Gln Gln Gly Arg Gly Glu Val Leu Gly	
	195 200 205 210	
70	gtg gtg gcg gag atc cag gag cgg cac ggc gcc gtg gcg gac ctg gag	850
	Val Val Ala Glu Ile Gln Glu Arg His Gly Ala Val Ala Asp Leu Glu	
	215 220 225	
75	cgg tcc ctg ctg gag ctg cag cag gtg ttc aac gac atg gcc gtg ctg	898
	Arg Ser Leu Leu Glu Leu Gln Gln Val Phe Asn Asp Met Ala Val Leu	
	230 235 240	
80	gtg gcg gcg cag ggg gag cag ctg gac gac atc gag ggc cac gtc ggg	946
	Val Ala Ala Gln Gly Glu Gln Leu Asp Asp Ile Glu Gly His Val Gly	
	245 250 255	
85	cgg gcg agg tcg ttc gtc gac cgc ggg cgc gag cag ctg cag gtg gca	994
	Arg Ala Arg Ser Phe Val Asp Arg Gly Arg Glu Gln Leu Gln Val Ala	
	260 265 270	
90	cgc aag cac cag aag agc tcc cgc aag tgg acc ttc atc ggc atc ggc	1042
	Arg Lys His Gln Lys Ser Ser Arg Lys Trp Thr Phe Ile Gly Ile Gly	

6



Val Ala Arg Lys His Gln Lys Ser Ser Arg Lys Trp Thr Phe Ile Gly  
 275 280 285

5 Ile Gly Ile Leu Leu Val Val Ile Leu Ile Ile Val Ile Pro Ile Val  
 290 295 300

10 Leu Lys Asn Thr Asn Lys Ser Asn Asn Asn Asn Ser Gln Gln  
 305 310 315

15 <210> 41  
 <211> 948  
 <212> DNA  
 <213> Arabidopsis thaliana

20 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(945)  
 <223> coding for Arabidopsis thaliana syntaxin 121  
 (SYP121) / syntaxin-related protein (SYR1)  
 (At3g11820)

25 <400> 41  
 atg gcg aat ccc gcg gga tca acc ggt ggt gtg aac ctc gac aag ttc 48  
 Met Ala Asn Pro Ala Gly Ser Thr Gly Gly Val Asn Leu Asp Lys Phe  
 1 5 10 15

30 ttc gaa gat gtt gaa tct gtg aaa gaa gag cta aag gag cta gat cgg 96  
 Phe Glu Asp Val Glu Ser Val Lys Glu Glu Leu Lys Glu Leu Asp Arg  
 20 25 30

35 ctc aac gaa aca ctc tct tca tgt cac gag cag agc aag acg ctt cac 144  
 Leu Asn Glu Thr Leu Ser Ser Cys His Glu Gln Ser Lys Thr Leu His  
 35 40 45

40 aat gct aaa gcc gtt aaa gat ctc cgg tct aaa atg gac ggt gac gtt 192  
 Asn Ala Lys Ala Val Lys Asp Leu Arg Ser Lys Met Asp Gly Asp Val  
 50 55 60

45 gga gtc gcg ttg aag aag gcg aag atg att aaa gtt aaa ctc gag gcg 240  
 Gly Val Ala Leu Lys Lys Ala Lys Met Ile Lys Val Lys Leu Glu Ala  
 65 70 75 80

cta gat cgt gcc aat gct gct aat cgg agt ctc cct ggc tgt gga cct 288  
 Leu Asp Arg Ala Asn Ala Ala Asn Arg Ser Leu Pro Gly Cys Gly Pro  
 85 90 95

50 ggt tct tcc tcc gat cga acc agg acc tct gtc ctc aat ggt ctc agg 336  
 Gly Ser Ser Ser Asp Arg Thr Arg Thr Ser Val Leu Asn Gly Leu Arg  
 100 105 110

55 aag aaa ttg atg gac tct atg gat agt ttc aac cga ttg agg gag ctt 384  
 Lys Lys Leu Met Asp Ser Met Asp Ser Phe Asn Arg Leu Arg Glu Leu  
 115 120 125

60 atc tcg tcc gag tat aga gaa act gta cag agg agg tac ttc acc gtc 432  
 Ile Ser Ser Glu Tyr Arg Glu Thr Val Gln Arg Arg Tyr Phe Thr Val  
 130 135 140

65 acc ggc gag aat ccg gat gaa cga acc cta gat cga ctg att tcc act 480  
 Thr Gly Glu Asn Pro Asp Glu Arg Thr Leu Asp Arg Leu Ile Ser Thr  
 145 150 155 160

gga gag agt gag aga ttc ttg cag aaa gca ata caa gaa caa gga aga 528  
 Gly Glu Ser Glu Arg Phe Leu Gln Lys Ala Ile Gln Glu Gln Gly Arg  
 165 170 175

70 gga agg gtg tta gac acc att aac gag att caa gaa agg cat gat gcg 576  
 Gly Arg Val Leu Asp Thr Ile Asn Glu Ile Gln Glu Arg His Asp Ala  
 180 185 190



## 39

	gtt	aaa	gac	att	gag	aag	aat	ctc	agg	gag	ctt	cac	cag	gtg	ttt	cta	624
	Val	Lys	Asp	Ile	Glu	Lys	Asn	Leu	Arg	Glu	Leu	His	Gln	Val	Phe	Leu	
			195					200					205				
5	gac	atg	gcc	gtg	ctg	gta	gag	cac	cag	gga	gct	cag	ctt	gat	gac	atc	672
	Asp	Met	Ala	Val	Leu	Val	Glu	His	Gln	Gly	Ala	Gln	Leu	Asp	Asp	Ile	
		210					215					220					
10	gag	agt	cat	gtg	ggt	cga	gct	agc	tcc	ttt	atc	aga	ggc	gga	act	gac	720
	Glu	Ser	His	Val	Gly	Arg	Ala	Ser	Ser	Phe	Ile	Arg	Gly	Gly	Thr	Asp	
	225					230					235					240	
15	cag	cta	caa	acc	gct	cgg	gtt	tac	cag	aag	aac	acg	cga	aaa	tgg	aca	768
	Gln	Leu	Gln	Thr	Ala	Arg	Val	Tyr	Gln	Lys	Asn	Thr	Arg	Lys	Trp	Thr	
					245					250					255		
20	tgt	att	gcc	att	att	att	ctc	atc	atc	atc	ata	act	gtt	gtg	gtt	ctt	816
	Cys	Ile	Ala	Ile	Ile	Ile	Leu	Ile	Ile	Ile	Ile	Thr	Val	Val	Val	Leu	
				260				265						270			
25	gct	gtt	tta	aaa	ccg	tgg	aac	aac	agc	agt	ggc	ggc	ggc	ggc	ggg	ggg	864
	Ala	Val	Leu	Lys	Pro	Trp	Asn	Asn	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	
			275				280						285				
30	ggg	ggg	ggg	ggg	acc	act	gga	gga	agt	caa	cca	aac	tca	ggg	aca	cca	912
	Gly	Gly	Gly	Gly	Thr	Thr	Gly	Gly	Ser	Gln	Pro	Asn	Ser	Gly	Thr	Pro	
		290					295					300					
35	cca	aac	cct	cct	cag	gca	agg	cgt	cta	ttg	cgt	tga					948
	Pro	Asn	Pro	Pro	Gln	Ala	Arg	Arg	Leu	Leu	Arg						
	305					310					315						
40	<210> 42																
	<211> 315																
	<212> PRT																
	<213> Arabidopsis thaliana																
45	<400> 42																
	Met	Ala	Asn	Pro	Ala	Gly	Ser	Thr	Gly	Gly	Val	Asn	Leu	Asp	Lys	Phe	
	1				5					10					15		
50	Phe	Glu	Asp	Val	Glu	Ser	Val	Lys	Glu	Glu	Leu	Lys	Glu	Leu	Asp	Arg	
				20					25					30			
55	Leu	Asn	Glu	Thr	Leu	Ser	Ser	Cys	His	Glu	Gln	Ser	Lys	Thr	Leu	His	
			35					40					45				
60	Asn	Ala	Lys	Ala	Val	Lys	Asp	Leu	Arg	Ser	Lys	Met	Asp	Gly	Asp	Val	
			50				55					60					
65	Gly	Val	Ala	Leu	Lys	Lys	Ala	Lys	Met	Ile	Lys	Val	Lys	Leu	Glu	Ala	
		65				70					75					80	
70	Leu	Asp	Arg	Ala	Asn	Ala	Ala	Asn	Arg	Ser	Leu	Pro	Gly	Cys	Gly	Pro	
					85				90					95			
75	Gly	Ser	Ser	Ser	Asp	Arg	Thr	Arg	Thr	Ser	Val	Leu	Asn	Gly	Leu	Arg	
				100					105					110			
80	Lys	Lys	Leu	Met	Asp	Ser	Met	Asp	Ser	Phe	Asn	Arg	Leu	Arg	Glu	Leu	
			115					120					125				
85	Ile	Ser	Ser	Glu	Tyr	Arg	Glu	Thr	Val	Gln	Arg	Arg	Tyr	Phe	Thr	Val	
		130					135					140					
90	Thr	Gly	Glu	Asn	Pro	Asp	Glu	Arg	Thr	Leu	Asp	Arg	Leu	Ile	Ser	Thr	
		145				150					155					160	
95	Gly	Glu	Ser	Glu	Arg	Phe	Leu	Gln	Lys	Ala	Ile	Gln	Glu	Gln	Gly	Arg	
					165					170					175		
100	Gly	Arg	Val	Leu	Asp	Thr	Ile	Asn	Glu	Ile	Gln	Glu	Arg	His	Asp	Ala	

	180	185	190	
	Val Lys Asp Ile Glu Lys Asn Leu Arg Glu Leu His Gln Val Phe Leu			
5	195	200	205	
	Asp Met Ala Val Leu Val Glu His Gln Gly Ala Gln Leu Asp Asp Ile			
	210	215	220	
10	Glu Ser His Val Gly Arg Ala Ser Ser Phe Ile Arg Gly Gly Thr Asp			
	225	230	235	240
	Gln Leu Gln Thr Ala Arg Val Tyr Gln Lys Asn Thr Arg Lys Trp Thr			
	245	250	255	
15	Cys Ile Ala Ile Ile Ile Leu Ile Ile Ile Ile Thr Val Val Val Leu			
	260	265	270	
	Ala Val Leu Lys Pro Trp Asn Asn Ser Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly			
20	275	280	285	
	Gly Gly Gly Gly Thr Thr Gly Gly Ser Gln Pro Asn Ser Gly Thr Pro			
	290	295	300	
25	Pro Asn Pro Pro Gln Ala Arg Arg Leu Leu Arg			
	305	310	315	
30	<210> 43			
	<211> 1275			
	<212> DNA			
	<213> Hordeum vulgare			
35	<220>			
	<221> CDS			
	<222> (80)..(1006)			
	<223> coding for Hordeum vulgare subsp. vulgare SNAP-34			
40	<400> 43			
	ggccctcca cccacccca ccagtcgct gcggatactt gattctgcta ctcggccagc 60			
	gatcgatctc gcctccgcc atg agc gcc acc agg ccc tcc ttc ttc ccc tcc 112			
	Met Ser Ala Thr Arg Pro Ser Phe Phe Pro Ser 1 5 10			
45	aac aac aac agg aac aag ccc gcc acc cgg aac ccc ttc gac tcc gac 160			
	Asn Asn Asn Arg Asn Lys Pro Ala Thr Arg Asn Pro Phe Asp Ser Asp 15 20 25			
50	tcg gac gac gac ggc ggc atg gcc cgg cgc ggc ccg gcg cgg gcc tcg 208			
	Ser Asp Asp Asp Gly Gly Met Ala Arg Arg Gly Pro Ala Arg Ala Ser 30 35 40			
55	tcc gtc ccg acc ccc gcc gcg ggg ccg gcc agg gcc tcc tcg gcc ccg 256			
	Ser Val Pro Thr Pro Ala Ala Gly Pro Ala Arg Ala Ser Ser Ala Pro 45 50 55			
60	atc ccc gcc gac gag gcg gac cag cgg ggc gcc ctg ttc ggc gcg ggc 304			
	Ile Pro Ala Asp Glu Ala Asp Gln Arg Gly Ala Leu Phe Gly Ala Gly 60 65 70 75			
	ccc gcg ccg tcc ggc ttc gcg tcc tcc tcc tcc gcg gcc gcc agg ggc 352			
	Pro Ala Pro Ser Gly Phe Ala Ser Ser Ser Ser Ala Ala Ala Arg Gly 80 85 90			
65	cgg tac agg aac gac ttc cgc gac tcg ggc ggc gtg gag gcg cag tcc 400			
	Arg Tyr Arg Asn Asp Phe Arg Asp Ser Gly Gly Val Glu Ala Gln Ser 95 100 105			
70	gtg cag gag ctc gag ggc tac gcg gcc tac aag gcc gag gag acc acg 448			
	Val Gln Glu Leu Glu Gly Tyr Ala Ala Tyr Lys Ala Glu Glu Thr Thr 110 115 120			

	cgc	cgg	gtc	gac	ggc	tgc	ctc	cgg	gtc	gcc	gag	gag	atg	cgg	gac	acc	496
	Arg	Arg	Val	Asp	Gly	Cys	Leu	Arg	Val	Ala	Glu	Glu	Met	Arg	Asp	Thr	
		125					130					135					
5	gcg	tca	aag	acc	ctg	ctc	cag	gtg	cac	cag	cag	ggc	cag	cag	atc	agg	544
	Ala	Ser	Lys	Thr	Leu	Leu	Gln	Val	His	Gln	Gln	Gly	Gln	Gln	Ile	Arg	
	140					145					150					155	
10	cgc	acc	cac	gcc	atg	gcc	gtc	gac	atc	gac	cag	gat	ctc	tcc	agg	ggg	592
	Arg	Thr	His	Ala	Met	Ala	Val	Asp	Ile	Asp	Gln	Asp	Leu	Ser	Arg	Gly	
					160					165					170		
15	gaa	aag	cta	cta	ggg	gat	ctt	ggg	ggg	ttg	ttt	tcc	aag	aag	tgg	aag	640
	Glu	Lys	Leu	Leu	Gly	Asp	Leu	Gly	Gly	Leu	Phe	Ser	Lys	Lys	Trp	Lys	
				175				180						185			
20	cca	aag	aag	aac	ggc	gca	atc	agg	ggc	cct	atg	ctg	acc	aga	gac	gat	688
	Pro	Lys	Lys	Asn	Gly	Ala	Ile	Arg	Gly	Pro	Met	Leu	Thr	Arg	Asp	Asp	
				190				195					200				
25	tcc	ttc	ata	cgc	aag	ggc	agc	cat	atg	gag	cag	agg	cat	aaa	ctg	ggg	736
	Ser	Phe	Ile	Arg	Lys	Gly	Ser	His	Met	Glu	Gln	Arg	His	Lys	Leu	Gly	
		205					210					215					
30	ctg	tca	gat	cgt	cgg	cat	cga	tcc	aat	gca	cgc	cag	ttc	cta	tct	gaa	784
	Leu	Ser	Asp	Arg	Pro	His	Arg	Ser	Asn	Ala	Arg	Gln	Phe	Leu	Ser	Glu	
	220					225					230					235	
35	ccc	aca	tca	ggc	ctt	gag	aaa	gtc	gag	gtg	gag	aag	gca	aag	cag	gat	832
	Pro	Thr	Ser	Gly	Leu	Glu	Lys	Val	Glu	Val	Glu	Lys	Ala	Lys	Gln	Asp	
					240				245						250		
40	gat	ggc	ctg	tct	gac	ctt	agc	gac	ata	ctg	aca	gag	ttg	aaa	gga	atg	880
	Asp	Gly	Leu	Ser	Asp	Leu	Ser	Asp	Ile	Leu	Thr	Glu	Leu	Lys	Gly	Met	
				255				260					265				
45	gcc	att	gac	atg	gga	act	gag	att	gag	ggg	caa	aca	aag	gat	ctt	ggg	928
	Ala	Ile	Asp	Met	Gly	Thr	Glu	Ile	Glu	Gly	Gln	Thr	Lys	Asp	Leu	Gly	
			270					275					280				
50	cat	gcg	gag	aag	gac	ttt	gac	gaa	ctt	aac	tac	agg	gtc	aag	ggg	gca	976
	His	Ala	Glu	Lys	Asp	Phe	Asp	Glu	Leu	Asn	Tyr	Arg	Val	Lys	Gly	Ala	
		285					290					295					
55	aac	gct	cga	aca	cgt	cgc	ctg	ctt	ggc	aga	taggcaagaa	gcatatgttg					1026
	Asn	Ala	Arg	Thr	Arg	Arg	Leu	Leu	Gly	Arg							
	300					305											
60	ttcaccagag	gattctgtga cactccttat cttctgcatt tgctttcgtg ggctgttaat															1086
65	tcagatcatt	ttgtgcataa aactctgggt aggaagggtc gttggggagt tgtatcaggg															1146
70	tttattgtgt	atatacgcta gacggggcggg tcgttttcta tgttcagtt gtactacatt															1206
75	tgctatggac	agtagatacg tttgtattcg gttttcttgt tttgcaatcg ctatgctgca															1266
80	ggaaagcac																1275
85	<210>	44															
90	<211>	309															
95	<212>	PRT															
100	<213>	Hordeum vulgare															
105	<400>	44															
110	Met	Ser	Ala	Thr	Arg	Pro	Ser	Phe	Phe	Pro	Ser	Asn	Asn	Asn	Arg	Asn	
115	1				5					10					15		
120	Lys	Pro	Ala	Thr	Arg	Asn	Pro	Phe	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Asp	Asp	Gly	
125				20					25					30			
130	Gly	Met	Ala	Arg	Arg	Gly	Pro	Ala	Arg	Ala	Ser	Ser	Val	Pro	Thr	Pro	
135			35					40					45				

Ala Ala Gly Pro Ala Arg Ala Ser Ser Ala Pro Ile Pro Ala Asp Glu  
50 55 60

5 Ala Asp Gln Arg Gly Ala Leu Phe Gly Ala Gly Pro Ala Pro Ser Gly  
65 70 75 80

Phe Ala Ser Ser Ser Ser Ala Ala Ala Arg Gly Arg Tyr Arg Asn Asp  
85 90 95

10 Phe Arg Asp Ser Gly Gly Val Glu Ala Gln Ser Val Gln Glu Leu Glu  
100 105 110

15 Gly Tyr Ala Ala Tyr Lys Ala Glu Glu Thr Thr Arg Arg Val Asp Gly  
115 120 125

Cys Leu Arg Val Ala Glu Glu Met Arg Asp Thr Ala Ser Lys Thr Leu  
130 135 140

20 Leu Gln Val His Gln Gln Gly Gln Gln Ile Arg Arg Thr His Ala Met  
145 150 155 160

Ala Val Asp Ile Asp Gln Asp Leu Ser Arg Gly Glu Lys Leu Leu Gly  
165 170 175

25 Asp Leu Gly Gly Leu Phe Ser Lys Lys Trp Lys Pro Lys Lys Asn Gly  
180 185 190

Ala Ile Arg Gly Pro Met Leu Thr Arg Asp Asp Ser Phe Ile Arg Lys  
195 200 205

Gly Ser His Met Glu Gln Arg His Lys Leu Gly Leu Ser Asp Arg Pro  
210 215 220

35 His Arg Ser Asn Ala Arg Gln Phe Leu Ser Glu Pro Thr Ser Gly Leu  
225 230 235 240

Glu Lys Val Glu Val Glu Lys Ala Lys Gln Asp Asp Gly Leu Ser Asp  
245 250 255

40 Leu Ser Asp Ile Leu Thr Glu Leu Lys Gly Met Ala Ile Asp Met Gly  
260 265 270

45 Thr Glu Ile Glu Gly Gln Thr Lys Asp Leu Gly His Ala Glu Lys Asp  
275 280 285

Phe Asp Glu Leu Asn Tyr Arg Val Lys Gly Ala Asn Ala Arg Thr Arg  
290 295 300

50 Arg Leu Leu Gly Arg  
305

55

08 SEP 2005

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
23. September 2004 (23.09.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 2004/081217 A3(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12N 15/82,  
C07K 14/415, C12N 15/29, A01H 5/00

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2004/002436

(22) Internationales Anmeldedatum:  
10. März 2004 (10.03.2004)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
103 11 118.2 12. März 2003 (12.03.2003) DE(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von  
US): BASF PLANT SCIENCE GMBH [DE/DE]; 67056  
Ludwigshafen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): FRANK, Markus  
[DE/DE]; Rheindammstrasse 30, 68163 Mannheim (DE).  
KOGEL, Karl-Heinz [DE/DE]; Berggartenstrasse 7,  
35457 Lollar (DE). HÜCKELHOVEN, Ralph [DE/DE];  
Glaubrechtstr. 12, 35392 Giessen (DE).(74) Anwalt: BIEBERBACH, Andreas; BASF Aktiengesellschaft,  
67056 Ludwigshafen (DE).(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für  
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,  
AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,  
CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES,  
FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,  
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,  
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,  
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM,  
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM,  
ZW.(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für  
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,  
GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,  
ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,  
TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,  
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT,  
RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,  
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen  
Recherchenberichts: 23. Dezember 2004Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-  
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-  
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der  
PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD FOR INCREASING RESISTANCE AGAINST STRESS FACTORS IN PLANTS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR ERHÖHUNG DER RESISTENZ GEGEN STRESSFAKTOREN IN PFLANZEN

(57) Abstract: The invention relates to a method for producing or increasing resistance against at least one biotic or abiotic stress factor in plants, preferably against plant pathogens, by increasing expression of at least one Bax inhibitor 1 (BI1) protein in at least one plant tissue, under the proviso that expression in leaf epidermis remains substantially unmodified. The invention relates further to recombinant expression cassettes and vectors that comprise a nucleic acid sequence coding for the BI protein under the control of a tissue-specific promoter, said promoter having substantially no activity in leaf epidermis. The invention further relates to recombinant plants that are transformed with said expression cassettes or vectors, to cultures, parts or recombinant propagation material derived thereof, and to the use of the same for producing food, feeding stuff, seeds, pharmaceuticals or fine chemicals.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft Verfahren zur Erzeugung oder Erhöhung der Resistenz gegen mindestens einen biotischen oder abiotischen Stressfaktor in Pflanzen, bevorzugt gegen pflanzliche Pathogene, durch Erhöhung der Expression mindestens eines Bax-Inhibitor 1 (BI1) Proteins in mindestens einem pflanzlichen Gewebe mit der Massgabe, dass die Expression in der Blattepidermis im wesentlichen unverändert bleibt. Die Erfindung betrifft ferner rekombinante Expressionskassetten und Vektoren, die eine für ein BI-Protein kodierende Nukleinsäuresequenz unter Kontrolle eines gewebespezifischen Promotors umfassen, wobei der Promotor im wesentlichen keine Aktivität in der Blattepidermis aufweist. Die Erfindung betrifft ferner mit besagten Expressionskassetten oder Vektoren transformierte rekombinante Pflanzen, davon abgeleitete Kulturen, Teile oder rekombinantes Vermehrungsgut, sowie die Verwendung derselben zur Herstellung von Nahrungs-, Futtermitteln, Saatgut, Pharmazeutika oder Feinchemikalien.

WO 2004/081217 A3

STK

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP2004/002436

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 7 C12N15/82 C07K14/415 C12N15/29 A01H5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 02/101079 A (PIONEER HI BRED INT) 19 December 2002 (2002-12-19) the whole document	1-11
A	US 2003/009785 A1 (REED JOHN C) 9 January 2003 (2003-01-09) paragraphs [0014] - [0019]	1-11
A	EP 0 864 650 A (DIRECTOR GENERAL OF NATIONAL I) 16 September 1998 (1998-09-16) abstract	1-11
A	WO 00/26391 A (UNIV NEBRASKA LINCOLN ;DICKMAN MARTIN B (US)) 11 May 2000 (2000-05-11) cited in the application page 4, lines 1-10	1-11
	----- -/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

1 July 2004

Date of mailing of the international search report

29.09.04

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Bilang, J

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	LINCOLN JAMES E ET AL: "Expression of the antiapoptotic baculovirus p35 gene in tomato blocks programmed cell death and provides broad-spectrum resistance to disease." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, Bd. 99, Nr. 23, 12. November 2002 (2002-11-12), Seiten 15217-15221, XP002286824 November 12, 2002 ISSN: 0027-8424 (ISSN print) Zusammenfassung	1-11
P,A	HUECKELHOVEN RALPH ET AL: "Overexpression of barley BAX inhibitor 1 induces breakdown of mlo-mediated penetration resistance to Blumeria graminis." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, Bd. 100, Nr. 9, 29. April 2003 (2003-04-29), Seiten 5555-5560, XP002286823 April 29, 2003 ISSN: 0027-8424 (ISSN print) Zusammenfassung	1-11
P,A	CHAE H-J ET AL: "Evolutionarily conserved cytoprotection provided by Bax Inhibitor-1 homologs from animals, plants, and yeast" GENE: AN INTERNATIONAL JOURNAL ON GENES AND GENOMES, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, BARKING, GB, Bd. 323, 24. Dezember 2003 (2003-12-24), Seiten 101-113, XP004477034 ISSN: 0378-1119 das ganze Dokument	1-11

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see supplemental sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:  
1-11

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/EP2004/002436**

**Box III**

The International Searching Authority has determined that this international application contains multiple (groups of) inventions, as follows:

Invention 1:                Claims 1-11

Method for generating or increasing stress resistance in plants by increasing the protein amount or function of a Bax inhibitor-1 (BI1) protein.

Invention 2:                Claims 12-20 (in part)

Polypeptide- and polynucleotide sequences coding for BI1 protein with the sequence as per SEQ ID NO:12.

Inventions 3-12:           Claims 12-20 (in part)

As invention 2, but for BI1 protein with one of the sequences as per SEQ ID NO:14, 16, 18, 20, 22, 24, 28, 30, 32 or 38.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/002436

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 02101079 A	19-12-2002	CA 2450669 A1	19-12-2002
		EP 1406484 A2	14-04-2004
		WO 02101079 A2	19-12-2002
		US 2003056249 A1	20-03-2003
US 2003009785 A1	09-01-2003	KEINE	
EP 0864650 A	16-09-1998	JP 3331367 B2	07-10-2002
		JP 10309142 A	24-11-1998
		AU 703009 B2	11-03-1999
		AU 5832398 A	17-09-1998
		CA 2231738 A1	11-09-1998
		CA 2375804 A1	11-09-1998
		CN 1436845 A	20-08-2003
		CN 1195026 A , B	07-10-1998
		EP 0864650 A2	16-09-1998
		JP 2000023583 A	25-01-2000
		JP 2002300822 A	15-10-2002
		US 6310272 B1	30-10-2001
		US 2003005480 A1	02-01-2003
WO 0026391 A	11-05-2000	AU 1241100 A	22-05-2000
		CA 2348705 A1	11-05-2000
		CN 1413257 T	23-04-2003
		EP 1161546 A2	12-12-2001
		JP 2002538769 T	19-11-2002
		WO 0026391 A2	11-05-2000

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/002436

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/82 C07K14/415 C12N15/29 A01H5/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 02/101079 A (PIONEER HI BRED INT) 19. Dezember 2002 (2002-12-19) das ganze Dokument	1-11
A	US 2003/009785 A1 (REED JOHN C) 9. Januar 2003 (2003-01-09) Absätze '0014! - '0019!	1-11
A	EP 0 864 650 A (DIRECTOR GENERAL OF NATIONAL I) 16. September 1998 (1998-09-16) Zusammenfassung	1-11
A	WO 00/26391 A (UNIV NEBRASKA LINCOLN ;DICKMAN MARTIN B (US)) 11. Mai 2000 (2000-05-11) in der Anmeldung erwähnt Seite 4, Zeilen 1-10	1-11
	-/-	



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*G\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche

1. Juli 2004

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

29.09.04

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Bilang, J

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP2004/002436

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>LINCOLN JAMES E ET AL: "Expression of the antiapoptotic baculovirus p35 gene in tomato blocks programmed cell death and provides broad-spectrum resistance to disease." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, vol. 99, no. 23, 12 November 2002 (2002-11-12), pages 15217-15221, XP002286824 November 12, 2002 ISSN: 0027-8424 (ISSN print) abstract</p>	1-11
P,A	<p>----- HUECKELHOVEN RALPH ET AL: "Overexpression of barley BAX inhibitor 1 induces breakdown of mlo-mediated penetration resistance to Blumeria graminis." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, vol. 100, no. 9, 29 April 2003 (2003-04-29), pages 5555-5560, XP002286823 April 29, 2003 ISSN: 0027-8424 (ISSN print) abstract</p>	1-11
P,A	<p>----- CHAE H-J ET AL: "Evolutionarily conserved cytoprotection provided by Bax Inhibitor-1 homologs from animals, plants, and yeast" GENE: AN INTERNATIONAL JOURNAL ON GENES AND GENOMES, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, BARKING, GB, vol. 323, 24 December 2003 (2003-12-24), pages 101-113, XP004477034 ISSN: 0378-1119 the whole document</p> <p>-----</p>	1-11

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP2004/002436

## Feld II Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr. \_\_\_\_\_  
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich \_\_\_\_\_
2. ☐ Ansprüche Nr. \_\_\_\_\_  
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich \_\_\_\_\_
3. ☐ Ansprüche Nr. \_\_\_\_\_  
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

## Feld III Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr. \_\_\_\_\_
4. ☒ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:  
1-11

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, dass diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

Erfindung 1: Ansprüche 1-11

Verfahren zur Erzeugung oder Erhöhung der Stressresistenz in Pflanzen durch Erhöhung der Proteinmenge oder Funktion eines Bax Inhibitor-1 (BI1) Proteins

---

Erfindung 2: Ansprüche 12-20 (Teilweise)

Polypeptid- und Polynukleotidsequenzen kodierend für BI1 Protein mit der Sequenz gemäss SEQ ID NO: 12

---

Erfindung 3-12: Ansprüche 12-20 (Teilweise)

wie Erfindung 2, jedoch BI1 Protein mit einer der Sequenzen gemäss SEQ ID NO: 14, 16, 18, 20, 22, 24, 28, 30, 32, oder 38.

---

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP2004/002436

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 02101079	A	19-12-2002	CA 2450669 A1	19-12-2002
			EP 1406484 A2	14-04-2004
			WO 02101079 A2	19-12-2002
			US 2003056249 A1	20-03-2003
-----				
US 2003009785	A1	09-01-2003	NONE	
-----				
EP 0864650	A	16-09-1998	JP 3331367 B2	07-10-2002
			JP 10309142 A	24-11-1998
			AU 703009 B2	11-03-1999
			AU 5832398 A	17-09-1998
			CA 2231738 A1	11-09-1998
			CA 2375804 A1	11-09-1998
			CN 1436845 A	20-08-2003
			CN 1195026 A ,B	07-10-1998
			EP 0864650 A2	16-09-1998
			JP 2000023583 A	25-01-2000
			JP 2002300822 A	15-10-2002
			US 6310272 B1	30-10-2001
			US 2003005480 A1	02-01-2003
-----				
WO 0026391	A	11-05-2000	AU 1241100 A	22-05-2000
			CA 2348705 A1	11-05-2000
			CN 1413257 T	23-04-2003
			EP 1161546 A2	12-12-2001
			JP 2002538769 T	19-11-2002
			WO 0026391 A2	11-05-2000
-----				

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**